

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

Die Rolle von sICAM und sEpCAM bei der Diagnostik der Präeklampsie

**Inaugural–Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen**

**vorgelegt von
Melissa Isabelle Cueillette
aus Essen
2017**

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. M. L. Heubner
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. R. Grümmer

Tag der mündlichen Prüfung: 19. März 2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Präeklampsie	5
1.1.1	Definition und Epidemiologie der Präeklampsie	5
1.1.2	Klinische Symptomatik der Präeklampsie	6
1.1.3	Risikofaktoren der Präeklampsie	8
1.1.4	Diagnostik der Präeklampsie	10
1.1.5	Therapie und Prophylaxe der Präeklampsie	12
1.1.6	Physiologie der Plazentation	15
1.1.7	Pathophysiologie der Präeklampsie	16
1.1.8	Adhäsionsmoleküle in der Schwangerschaft	18
1.2	Adhäsionsmoleküle	20
1.2.1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)	20
1.2.2	Epithelial Cellular Adhesion Molecule (EpCAM)	22
1.3	Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)	27
1.3.1	Auswahl der Polymorphismen für diese Arbeit	28
1.4	Fragestellung dieser Arbeit	29
2	Materialien und Methoden	
2.1	Geräte und Materialien	31
2.1.1	Geräte	31
2.1.2	Chemische Reagentien und biologisches Material	32
2.1.3	Klinische Daten	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	34
2.2.2	sICAM-ELISA	37
2.2.3	sEpCAM-ELISA	37
2.2.4	DNA-Extraktion	38
2.2.5	Polymerasekettenreaktion	39
2.2.6	Analyse der Polymorphismen	40

2.2.7	Statistik.....	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Auswertung der Serumkonzentrationen von sICAM und sEpCAM.....	43
3.2	Analyse der Polymorphismen	46
3.2.1	ICAM-1-Polymorphismus rs5498.....	46
3.2.2	EpCAM-Polymorphismus rs1126497	48
3.2.3	EpCAM-Polymorphismus rs1421	50
3.3	Auswertung der klinischen Parameter.....	52
3.3.1	Einfluss der Polymorphismen auf Frühgeburtlichkeit und Geburtsgewicht	52
3.3.2	Einfluss von sICAM und sEpCAM auf die Frühgeburtlichkeit und das Geburtsgewicht.....	58
3.3.3	Einfluss von Gravidität und Parität auf die Serumkonzentration von sICAM und sEpCAM	61
4	Diskussion.....	63
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis.....	71
7	Abkürzungsverzeichnis	81
8	Danksagung	83
9	Lebenslauf.....	84

1 Einleitung

1.1 Präeklampsie

1.1.1 Definition und Epidemiologie der Präeklampsie

Die Präeklampsie (PE) ist eine multisystemische Erkrankung in der Schwangerschaft, die bei etwa 2 % aller Schwangeren in Europa auftritt, wobei in 60-70 % Erstgebärende betroffen sind. Die Inzidenz variiert teilweise je nach Bevölkerung, Studie und Definition. Die Präeklampsie ist eine der Hauptursachen mütterlicher Mortalität (10-15 % der mütterlichen Mortalität bei 4/100.000 Lebendgeburten), sowie von Frühgeburtlichkeit (25 %), perinataler Mortalität (7-12 % bei einer perinatalen Mortalität von 540/100.000) und intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) in den westlichen Industrienationen (AWMF-Leitlinie 2013; Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung).

Sowohl junge als auch ältere Erstgebärende haben ein erhöhtes Risiko für eine Präeklampsie, den größten Teil der Patientinnen machen Frauen vor dem 20. oder nach dem 35. Lebensjahr aus. Vor allem der Anteil der über 35-jährigen Schwangeren steigt in den Industrieländern deutlich an, was durch besser planbare Schwangerschaften und längere Ausbildungszeiten zu erklären ist. Das Durchschnittsalter einer Schwangeren in Deutschland liegt derzeit bei ca. 30 Jahren.

Die Leitsymptome einer Präeklampsie sind Hypertonie, Proteinurie und Ödeme. Daher wurden früher die Bezeichnungen Schwangerschaftstoxikose oder EPH-Gestose verwendet (engl.: edema, proteinurea, hypertension) (Sibai et al. 2005).

Die International Society for the Study of Hypertension (ISSHP) unterscheidet bei der Einteilung die chronische Hypertonie, die schwangerschaftsinduzierte Hypertonie, bei der es zu keiner Proteinurie kommt, die Präeklampsie mit den bereits genannten Leitsymptomen und die Eklampsie als Maximalausprägung der Erkrankung (Banner-Todesca et al. 1998).

Ca. 75 % aller Präeklampsien treten nahe am Geburtstermin auf und verlaufen eher milde, sodass die Gefahr für Mutter und Fetus gering ist. Je früher die Erkrankung auftritt, desto schwerer ist der Verlauf einzuschätzen. Ein guter Grenzwert ist hier die 34. Schwangerschaftswoche (SSW). Ein Auftreten der Symptome vor der 34. Schwangerschaftswoche wird als early-onset Präeklampsie bezeichnet, danach als late-onset Präeklampsie. Beide Varianten unterscheiden sich durch die Pathophysiologie und die Komplikationen für Mutter und Kind, wobei die early-onset Präeklampsie häufiger mit

einer abnormalen Plazentation vergesellschaftet sein soll (Raymond, D., Peterson, E. 2011).

Bei ca. 10 % aller Präeklampsien kommt es zur Eklampsie, welche zusätzlich durch das Auftreten von neurologischen Symptomen (Kopfschmerzen, Sehstörungen, Krampfanfälle) charakterisiert ist. Diese tritt meistens gegen Ende des dritten Trimenons auf, kann sich aber auch noch bis zu 48 Stunden nach der Geburt manifestieren (Sibai et al. 2005).

1.1.2 Klinische Symptomatik der Präeklampsie

Die Kardinalsymptome der Präeklampsie sind definiert als Hypertonie, Proteinurie und Ödembildung.

Eine Hypertonie besteht definitionsgemäß dann, wenn ein systolischer Blutdruck von > 140 mmHg, ein diastolischer Blutdruck von > 90 mmHg oder beides bei mindestens zwei unabhängigen Messungen festgestellt wurde oder der Blutdruck bei einmaliger Messung systolisch > 160 mmHg oder diastolisch > 100 mmHg liegt. Des Weiteren sollen die Einzelmessungen weniger als sieben Tage auseinander liegen. Entsprechende Blutdruckkontrollen sollten ab der 20. Schwangerschaftswoche vorgenommen werden, sofern vorher keine präexistente Hypertonie bestand. Bestand bereits vor der Schwangerschaft eine Hypertonie, spricht man von einer chronischen Hypertonie (Sibai et al. 2005).

Von einer Proteinurie spricht man, wenn im Sammelurin über 24 h mehr als 300 mg Gesamteiweiß gemessen werden. Alternativ kann der Proteingehalt im Urin auch mittels Teststreifen bestimmt werden. Hier spricht man ab 300 mg/l von einer Proteinurie ($> 1+$ auf dem Teststreifen z. B. Ur-o-test 10S von Keul GmbH). Auch hier sollten die Messungen nicht mehr als sieben Tage auseinander liegen. Da die Teststreifenmethode deutlich ungenauer ist und die Proteinausscheidung mit dem Urin über den Tag verteilt schwankt, ist die 24 h-Sammelmethode vorzuziehen.

Eine schwere Präeklampsie liegt bei schwerer Hypertonie ($> 160/90$ mmHg) in Kombination mit Proteinurie oder bei Hypertonie in Kombination mit schwerer Proteinurie (≥ 5 g/d) vor (AWMF-Leitlinie 2013, Myers, J., Baker, P. 2002, Tranquilli et al. 2012).

Weitere Symptome sind Ödeme, Oligurie (< 500 ml/d), Thrombozytopenie (< 100.000 / μ l), erhöhte Leberenzymwerte und Allgemeinsymptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Flimmern vor den Augen, Sehstörungen, Müdigkeit und Oberbauchschmerzen.

Diese Kriterien lassen sich ausschließlich bei gesunden, vormals normotensiven Schwangeren anwenden. Besteht bereits vor der 20. Schwangerschaftswoche eine

Hypertonie oder werden blutdrucksenkende Medikamente eingenommen, sind diese Kriterien nicht zuverlässig (Baumwell, S., Karumanchi, S. A. 2007).

Des Weiteren kann die Präeklampsie vollkommen ohne klinische Symptome ablaufen, was eine Früherkennung erschwert. Vielfach sind die Schwangeren durch die erhöhten Blutdruckwerte in keiner Weise beeinträchtigt und zeigen auch keine anderen Früherscheinungen.

Bei Patientinnen mit schwerer Präeklampsie treten neben den drei Kardinalsymptomen zusätzlich vegetative Symptome auf. Diese können von Übelkeit und Erbrechen bis zu Augenflimmern, temporärem Visusverlust, Kopfschmerzen und Hyperreflexie reichen. Diese Patientinnen müssen engmaschig überwacht werden, da hier die große Gefahr einer Eklampsie besteht (Sibai, B. 2005).

Der Verlauf und die Schwere der Erkrankung hängen von verschiedenen Faktoren ab. Zu diesen zählen zum einen die Risikofaktoren und Vorerkrankungen in der Schwangerschaft, zum anderen hängt der Verlauf auch vom Gestationsalter des Feten bei Erstauftreten der Erkrankung ab. Mittlerweile unterscheidet man eine early-onset Präeklampsie, die vor der 34. SSW beginnt, von einer late-onset Präeklampsie, die nach der 34. SSW beginnt. Der early-onset Typ geht in der Regel mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung einher, welche sich bei dieser Verlaufsform der Präeklampsie regelhaft findet. Bei dem late-onset Typ sind die meisten Säuglinge für ihr Gestationsalter normal entwickelt und IUGR tritt nur selten auf (Vatten, L.J., Skjaerven, R. 2004, Tranquilli et al. 2012).

Die Eklampsie stellt zusammen mit dem HELLP-Syndrom die schwerste Verlaufsform dieser Erkrankung dar. Die Eklampsie ist charakterisiert durch das Auftreten von Krampfanfällen, deren genaue Ursache nicht bekannt ist. Man vermutet, dass dabei zerebrale Vasospasmen, Ödeme und auch eine verminderte Autoregulation des zerebralen Drucks durch extrem hohe Blutdrücke eine Rolle spielen (Hladunewich et al. 2007).

Bei den Frauen mit Eklampsie traten besonders tonisch-klonische Krampfanfälle auf, bei 57 % waren vorher Hypertonie und Proteinurie festgestellt worden, in 11 % der Fälle traten die Krämpfe auch ohne vorher dokumentierte Hypertonie und Proteinurie auf. Bei 59 % der Frauen waren vorher Symptome wie Kopfschmerzen und Sehstörungen aufgetreten. Eine manifeste Eklampsie führt zu einer deutlich längeren Dauer des Krankenhausaufenthalts und kann in einigen Fällen auch zum Tod der Mutter führen (2 %) (Douglas, K.A., Redman, C.W.G. 1994).

Bei 10-15 % der Schwangeren mit Präeklampsie kommt es zu einer Hämolyse, erhöhten Leberwerten und einer Thrombozytopenie. Diese Komplikation wird als HELLP-Syndrom bezeichnet. Das HELLP-Syndrom stellt zusammen mit der Eklampsie die schwerste

Verlaufsform dieser Erkrankung dar. Diese Patienten fallen typischerweise im frühen dritten Trimenon mit rechtsseitigen Oberbauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen auf. Sie können, müssen aber nicht, die typischen Symptome einer Präeklampsie aufweisen, häufig wird diese Diagnose auch erst zusammen mit dem HELLP-Syndrom gestellt. Die häufigste mütterliche Komplikation ist die intravaskuläre Koagulopathie (30 %), es können aber auch eine akute Plazentaablösung oder ein akutes Nierenversagen auftreten. Die maternale Mortalität liegt hier etwa bei 2,6 % (Reubinoff, B.E., Schenker, J.G. 1991).

In den meisten Fällen sind die Symptome der Präeklampsie vollständig reversibel, sobald die Schwangerschaft beendet ist. Es wurden jedoch auch Langzeitr Risiken beschrieben. So haben Patientinnen nach einer Präeklampsie ein erhöhtes Risiko für das frühzeitige Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, für Schlaganfälle und eine eingeschränkte Nierenfunktion. Bisher sind jedoch noch keine Früherkennungsuntersuchungen bezüglich solcher Komplikationen für Patientinnen nach einer Präeklampsie implementiert (Paauw et al. 2016).

1.1.3 Risikofaktoren der Präeklampsie

Die Risikofaktoren der Präeklampsie sind vielfältig und lassen sich größtenteils aus der aktuellen Anamnese (Krankenvorgeschichte, Familienanamnese) ermitteln.

Die Präeklampsie ist eine Erkrankung, die häufiger bei Erstgebärenden beobachtet wird und bei diesen mit einer Häufigkeit von 6 % vorkommt. Bei Zweitgebärenden, die keine Komplikationen während der ersten Schwangerschaft hatten, kommt die Präeklampsie nur mit einer Häufigkeit von 0,3 % vor. 60 % der erkrankten Schwangeren sind Nulliparae. Das Wiederholungsrisiko liegt bei ca. 45 %. Des Weiteren findet man auch in den verschiedenen ethnischen Gruppen ein unterschiedliches Auftreten, wobei Frauen afroamerikanischer Abstammung häufiger betroffen sind als weiße Frauen (Steinhard, J., Klockenbusch, W. 1999).

Das vermehrte Auftreten von Präeklampsien in einzelnen Familien lässt auf eine genetische Disposition schließen. Man vermutet, dass es sich hierbei um ein rezessives Vererbungsmuster mit Beteiligung mehrerer Gene handelt. Rein rechnerisch ließe sich über das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht eine Genfrequenz von 0,2 bis 0,25 % ermitteln, womit sich eine Präeklampsieinzidenz von ca. 5 % errechnen lässt. Dies ergibt ein Risiko von 22 % für eine Erstgebärende, wenn bereits die Mutter der Schwangeren erkrankt war, für die der Schwester einer Präeklampsiepatientin wiederum ein Risiko von 39 % (Dekker, G.A. 1994).

Auch das Alter der Frauen spielt eine wichtige Rolle. Studien haben ergeben, dass Frauen über 40 Jahre ein 2-3-fach erhöhtes Risiko haben, eine Präeklampsie zu

entwickeln im Vergleich zu Frauen vor dem 40. Lebensjahr. Generell gilt, dass das Risiko ab dem 34. Lebensjahr mit jedem weiteren Jahr um 30 % ansteigt (Saftlas et al. 1990).

Da das durchschnittliche Alter bei Erstgebärenden in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen ist, kann die Präeklampsie in den nächsten Jahren eine ansteigende Inzidenz erfahren.

Ein weiterer Risikofaktor ist eine Mehrlingsschwangerschaft, bei der ein dreifach erhöhtes Risiko eine Präeklampsie zu entwickeln im Vergleich zu Einlingsschwangerschaften besteht (Lee et al. 2000).

Ob Adipositas ebenfalls zu einem vermehrten Auftreten von Präeklampsie führt, ist nicht eindeutig gesichert, aber Studien weisen darauf hin, dass bei einem Body Mass Index (BMI) > 35 ein doppelt so hohes Risiko vorliegt (Lee et al. 2000).

Neben der aktuellen Anamnese und der Familienanamnese gilt es auch, die erweiterte Eigenanamnese der Patientin zu erfragen. Verschiedene Vorerkrankungen sind mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Präeklampsie verbunden.

Liegt bereits vor der 20. SSW ein erhöhter Blutdruck vor, spricht man von einer chronischen Hypertonie. Die betroffenen Frauen entwickeln mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 25 % eine Präeklampsie. Zusätzlich sind das Auftreten von perinataler Morbidität, IUGR und das Auftreten von Frühgeburten vor der 32. SSW deutlich erhöht (McCowan et al. 1996).

Eine weitere bedeutende Vorerkrankung ist der Diabetes mellitus Typ 2. Je nach Ausprägung der Erkrankung steigt das Risiko der Präeklampsie auf 14-21 %. Allerdings findet man in diesem Fall bei verschiedenen Autoren deutlich abweichende Werte. Bei einem bekannten Diabetes mellitus Typ 1 steigt das Risiko einer Präeklampsie um das Dreifache an. Weiterhin steigt die perinatale Mortalität bei vorliegendem Diabetes mellitus Typ 1 in Kombination mit Präeklampsie auf 60/1000 Geburten. Liegt bereits eine diabetische Nephropathie vor, muss diese Zahl noch einmal nach oben korrigiert werden (Garner, P. 1995).

Weitere wichtige Risikofaktoren der Präeklampsie sind Autoimmun- und Gerinnungsstörungen, welche sich aus der Pathophysiologie ergeben. Hierbei besonders hervorzuheben sind die APC-Resistenz, der Protein-S-Mangel, die Hyperhomozysteinämie, der Nachweis von Anticardiolipin- oder Antiphospholipid-Antikörpern und der systemische Lupus erythematoses (Steinhard, J.; Klockenbusch, W. 1999).

Das Risiko für eine Präeklampsie steigt, wenn vor Konzeption eine verminderte Spermienexposition des Kindsvaters vorgelegen hat. Das Immunsystem der Mutter reagiert auf die Spermien zunächst mit Abwehrmechanismen wie bei einer Entzündung. Bei regelmäßiger Spermienexposition kommt es zu einer verminderten inflammatorischen

Reaktion der Mutter im Sinne eines Gewöhnungseffektes. Daher kommt es bei länger andauernder Spermienexposition zu einer protektiven Wirkung. Bei einem Partnerwechsel liegt dieser Effekt dann zunächst nicht mehr vor (Saftlas et al. 2003).

Ein weiterer protektiver Faktor liegt vor, wenn in einer Partnerschaft bereits eine Schwangerschaft ohne Präeklampsie oder Abort verlaufen sind. Auch hier ist eine Risikoreduktion nach einem Partnerwechsel nicht mehr nachzuweisen.

Für das Vorliegen weiterer paternaler Faktoren spricht die Beobachtung, dass beim Vorliegen einer Präeklampsie in einer Schwangerschaft einer vorherigen Beziehung in einer weiteren Beziehung des Kindsvaters erneut ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie besteht. Im Umkehrschluss verringert sich das Risiko, dass bei einer Partnerin eine Präeklampsie auftritt, wenn sich bei dem Mann aus einer vorherigen Partnerschaft mit Schwangerschaft keine Präeklampsie eruieren lässt (Sibai et al. 2005).

1.1.4 Diagnostik der Präeklampsie

Bislang gibt es keine aussagekräftige Vorhersagemethode, mit der die Präeklampsie frühzeitig und sicher zu diagnostizieren ist. Obwohl die pathophysiologischen Mechanismen bereits im ersten Trimenon auftreten, manifestieren sich die klinischen Symptome zumeist erst ab dem zweiten Trimenon.

Der Nachweis einer Präeklampsie lässt sich heute vor allem über die Erhebung von standardisierten Parametern erbringen, da die Präeklampsie in vielen Fällen auch zunächst asymptomatisch verlaufen kann. Zu den Standards gehören in erster Linie die Blutdruckmessung, die Bestimmung der Proteinurie mit Teststreifen oder nach der 24 h – Sammelmethode, sowie der klinische Nachweis von Ödemen. Die Cut-off Werte für die Diagnosestellung sind oben bereits erläutert worden.

Ein weiteres etabliertes Verfahren ist die Dopplersonographie, die durch ihre nicht-invasive Durchführung von den Patientinnen sehr gut toleriert wird. Durch die Umwandlung der Spiralarterien während der Plazentation wird die Durchblutung der Arteriae uterinae beeinflusst. Dies kann man am veränderten Flussprofil der A. uterina erkennen. Bei normaler Plazentation findet man zum einen das Verschwinden der postsystolischen Inzisur (Notch) durch die Verringerung des Gefäßwiderstandes und zum anderen einen erhöhten diastolischen Blutfluss, der sich anhand von Widerstandsindizes berechnen lässt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patientinnen, die eine Präeklampsie entwickeln, signifikant höhere Widerstandsindizes aufweisen. Dies trifft insbesondere auf die early-onset Präeklampsie zu (Myatt et al. 2012).

Als Screening wird die Untersuchung in der 24. – 26. SSW empfohlen, da hier die Plazentation abgeschlossen sein sollte. Gemessen wird an der A. uterina, wobei ein

Notch als Analysekriterium genommen wird. Wichtig ist, die Lage der Plazenta zu beachten, da durch verschiedene Gefäßverläufe leicht Messfehler entstehen können. Bei beidseitigem Notch liegt die Sensitivität bei ca. 50 % und bei beidseitigen normalen Blutflüssen die Spezifität bei ca. 97 %, was eine Risikoschwangerschaft nahezu ausschließt (Steiner H. 2001).

Des Weiteren werden laborchemisch das Haptoglobin, die Thrombozytenzahlen und die Leberwerte bestimmt. Diese sind erforderlich, um ein HELLP-Syndrom mit Hämolyse, Thrombozytenabfall und erhöhten Leberwerten nachzuweisen beziehungsweise in der Verlaufskontrolle eine Veränderung zu erkennen.

Wünschenswert wäre eine Screeningmethode, mit der man gefährdete Patientinnen vor der Manifestation der Erkrankung und den damit verbundenen Risiken und Komplikationen frühzeitig erkennen könnte.

Mittlerweile sind verschiedenste Ansätze zur Diagnostik und Vorhersage der Präeklampsie untersucht worden, die jedoch nicht effektiv genug sind, um in der Schwangerschaftsfrühuntersuchung eingesetzt zu werden. Ein in der täglichen Praxis einsetzbarer Screening-Test sollte zum einen sensitiv sein und zum anderen kosten- und zeiteffektiv durchgeführt werden können.

Ein erster Ansatz zur Früherkennung stellte die Blutdruckmessung im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen dar. In einer Studie von Page und Christianson wurden 14833 Schwangere eingeschlossen und untersucht. Gemessen wurde der MAD-II-Wert, d. h. der mittlere arterielle Druck im 2. Trimenon der Schwangerschaft. Als cut-off wurde ein MAD-II von 90 mmHg angegeben. Der positive Vorhersagewert lag hier bei 8 %. Auch bei einer 24 h-Blutdruckmessung sind über den Tag verteilt die MAD-II Werte nicht signifikant höher (Page, E.W., Christianson, R. 1976).

Auch im normalen Standardlabor gibt es keine Parameter, mit denen eine beginnende Präeklampsie sicher zu diagnostizieren ist.

Ein relativ neuer Ansatz ist die Bestimmung des placental growth factors (PlGF). Es konnte nachgewiesen werden, dass besonders im zweiten Trimenon bei Patientinnen mit Präeklampsie ein signifikant niedrigerer Serumspiegel von PlGF im Serum nachgewiesen werden konnte und somit zur Frühdiagnostik geeignet ist (Ghosh et al. 2011).

Parallel dazu wurde die Serumkonzentration der löslichen fms-like Tyrosinkinase (sFlt-1) gemessen. Hier zeigten sich deutlich höhere Serumparameter bei Patientinnen mit hypertensiver Schwangerschaftserkrankung. Als Standard gilt die Bestimmung der sFlt-1/PlGF-ratio, welche bei Präeklampsie signifikant erhöht ist (Verloren et al. 2012).

Auch in einer neuen Arbeit von Chelli et al. konnte dieses Ergebnis in einer Studie von 2016 reproduziert werden. Hier wiesen nicht nur Patientinnen mit einer Präeklampsie signifikant höhere Werte der sFlt-1/PlGF ratio im Vergleich zu Gesunden auf, sondern es

konnte auch gezeigt werden, dass sich Patientinnen mit einem schwereren Krankheitsverlauf signifikant von denen mit einer milden Verlaufsform unterscheiden (Chelli et al. 2016). Derzeit wird die Bestimmung der sFlt-1/PIGF ratio nach den Leitlinien im zweiten Trimenon empfohlen (AWMF-Leitlinie 2013).

Ein weiterer möglicher Ansatz für die Diagnostik sind die Endothelzelladhäsionsmoleküle sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule 1). Diese sind in verschiedenen Studien untersucht worden, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen. Besonders auf die mögliche Bedeutung von sICAM-1 wird im weiteren Verlauf genauer eingegangen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele Marker, die auf Grund der Pathophysiologie als mögliche Prädiktionsfaktoren angesehen wurden, zwar zum Teil leichte Unterschiede zwischen gesunden und präeklampsischen Schwangeren zeigen, dass aber bisher kein Marker eine Präeklampsie sicher und frühzeitig diagnostizieren kann.

1.1.5 Therapie und Prophylaxe der Präeklampsie

Die Therapie der Präeklampsie beruht auf verschiedenen Ansätzen, die von diätetischen Maßnahmen bis zu medikamentösen Methoden reichen. Bei manifester Präeklampsie ist die Beeinflussung des Krankheitsverlaufes kaum möglich, deshalb steht vor allem die Prophylaxe mütterlicher Komplikationen im Vordergrund.

Die einzige in Deutschland empfohlene Prophylaxe der Präeklampsie ist die Gabe von Acetylsalicylsäure in der frühen Schwangerschaft in einer Dosierung von 75-150 mg/d bis zur 34. SSW. Dies wird für Patientinnen mit einem erhöhten Risiko für eine Präeklampsie empfohlen und senkt signifikant das Risiko für eine Präeklampsie vor der 37. SSW, eine generelle Prophylaxe für alle Schwangeren wird jedoch nicht empfohlen (AWMF-Leitlinie von 2013).

In einem Cochrane review von Knight et al. 2000 ergab sich eine Risikoreduktion für Präeklampsie von 19 % sowie eine verminderte fetale Sterblichkeit von 16 %. Des Weiteren traten weniger Frühgeburten und intrauterine Wachstumsretardierungen auf. Bei schweren vorbestehenden Risikofaktoren wie Hypertension oder Diabetes mellitus konnte kein Vorteil durch diese Therapie nachgewiesen werden (Knight et al. 2000).

Eine antihypertensive Therapie wird in der Regel nur dann eingeleitet, wenn die mütterlichen Blutdruckwerte 170/110 mmHg übersteigen. Ab diesen Werten ist die Gefahr von zerebralen, zerebrovaskulären und weiteren Komplikationen der Hypertonie so hoch, dass der Einsatz von Antihypertensiva gerechtfertigt ist. Darunter liegende Werte sollten nur mit Vorsicht gesenkt werden, da der Fetus einen gewissen Perfusionsdruck benötigt,

um ausreichend versorgt zu werden. Bei zu starker Blutdrucksenkung steigt die Inzidenz von IUGR deutlich an. Das Antihypertensivum der ersten Wahl ist α -Methyldopa. Die Dosierung beträgt 250-500 mg p.o. 2-4x/d. Des Weiteren ist Nifedipin in der Akuttherapie primär einsetzbar. Das früher empfohlene Dihydralazin wird auf Grund von maternalen Nebenwirkungen nicht mehr empfohlen. Der Nutzen von β -Blockern ist umstritten, sollte er jedoch nötig sein, wäre hier Metoprolol das Mittel der ersten Wahl. Postpartal kann die Blutdruckmedikation entweder reduziert werden oder bei Bedarf nach den Empfehlungen der Deutschen Hochdruckliga entsprechend umgestellt werden (Magee, L.A., Duley, L. 2003, S1-Leitlinie der AWMF 2013).

Die einzige kausale Therapie für die Mutter stellt die Entbindung dar. Diese wird jedoch meist hinausgezögert, um das Outcome für das Kind zu verbessern. Die Entscheidung hängt demnach zum einen vom Schwangerschaftsalter und zum anderen von der Schwere der Präeklampsie ab. Nach der 37. SSW ist die sofortige Entbindung indiziert. Zwischen der 34. und 37. SSW sollte je nach Schwere der Erkrankung zwischen dem Risiko von Komplikationen durch die Frühgeburt und durch die Präeklampsie abgewogen werden. Ein Hinauszögern der Schwangerschaft über die 37. SSW ist jedoch nicht sinnvoll.

Vor der 34. SSW sollte die Behandlung in einem Perinatalzentrum erfolgen, um eine kontinuierliche Überwachung von Mutter und Kind zu gewährleisten. Ein konservatives Vorgehen ist so lange wie möglich anzustreben, da die Verlängerung der Schwangerschaft hier deutliche Vorteile für das Kind bringt. Bei schwerer Präeklampsie sollte jedoch eine Lungenreifung mit Steroiden begonnen werden, um das Risiko eines Atemnotsyndroms bei einer zeitnahen Entbindung zu senken.

Das unten folgende Schema von Sibai et al. soll das Vorgehen bei Präeklampsie erläutern (Sibai et al. 2005, S1-Leitlinie der AWMF 2013):

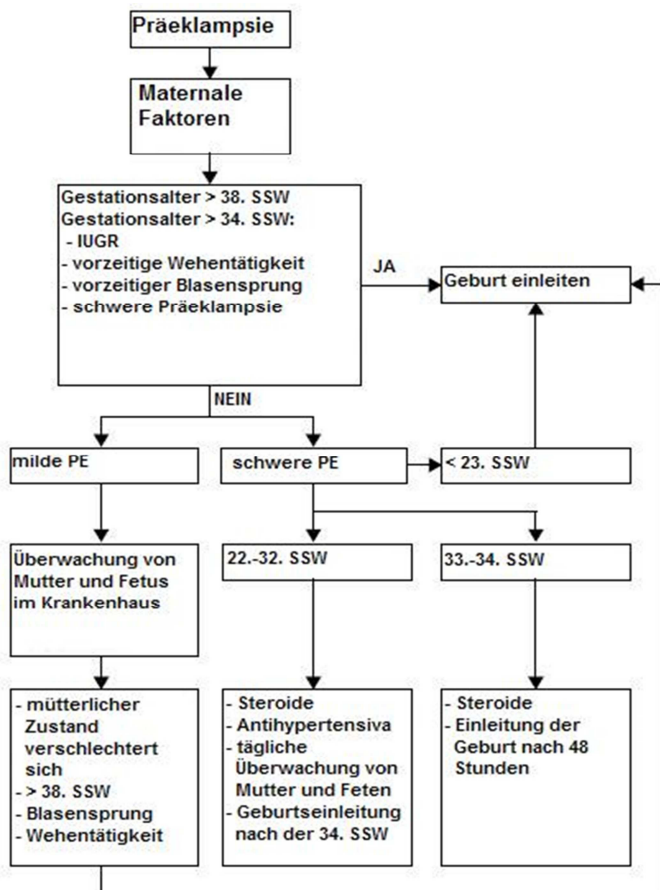


Abbildung 1: Therapieschema Präeklampsie nach Sibai et al. (2005)

Als Antikonvulsivum bei eklamptischen Anfällen oder als Prophylaxe bei schwerer Präeklampsie hat sich Magnesium in einer Studie gegenüber Phenytoin und Diazepam als wirksamer erwiesen. Dies bezog sich sowohl auf das mütterliche als auch auf das fetale Outcome. Magnesium wird mit einer Initialdosis von 4-6 g i. v. begonnen, zunächst als Kurzinfusion, anschließend sollte eine Erhaltungstherapie mit 1 g/h mittels Perfusor fortgesetzt werden. Eine Überwachung auf der Intensivstation ist hierbei obligat, um das Eintreten von Symptomen möglichst frühzeitig zu diagnostizieren und eine Progression somit schnell zu erkennen (Duley et al. 1995, S1-Leitlinie AWMF von 2013).

Eine eiweiß- und kochsalzarme Diät sowie die Substitution von Zink, Magnesium und Fischölen hat keine Risikoreduktion für die Präeklampsie ergeben. Auch die Gabe von Vitamin C und E als Antioxidantien und Radikalfänger wird nicht standardmäßig empfohlen, da sich zwar in manchen Studien eine leichte Verminderung der Präeklampsieinzidenz gezeigt hat, diese jedoch nicht in großen multizentrischen Studien nachgewiesen wurde. Es konnte jedoch kein negativer Effekt für Mutter und Kind nachgewiesen werden (Chappell et al. 1999). Eine gesicherte Wirksamkeit für Dexamethason wurde ausschließlich für die Lungenreifung des Feten belegt, welches bei notwendiger Geburtseinleitung möglichst schnell verabreicht werden sollte (Amorim et al. 1999).

1.1.6 Physiologie der Plazentation

Da die Plazentation ein entscheidender Faktor in der Pathophysiologie der Präeklampsie zu sein scheint, soll zunächst kurz auf die physiologische Entwicklung der Plazenta eingegangen werden.

Die Plazenta entwickelt sich physiologischerweise zu Beginn des 4. Schwangerschaftsmonats aus dem fetalen Chorion frondosum und aus der mütterlichen Dezidua basalis, welche dem umgeformten Endometrium entspricht (Lüllmann-Rauch, R. 2006).

Eine spezielle Population der Trophoblastzellen, die extravillösen Trophoblasten, wandert in die Dezidua ein und bildet Zellsäulen, die über Haftzotten fetale und maternale Kompartimente miteinander verbinden. Dabei erfolgt die Durchwanderung bis in das innere Drittel des Myometriums (Huppertz et al. 2005). Die Zellen nutzen Proteasen, um die Deziduazellen aufzulösen und nutzen den hohen Lipid- und Glykoproteinanteil zur Ernährung des Embryos (histiotrophe Phase). Die sogenannten endovaskulären Trophoblasten invadieren die maternalen Spiralarterien und führen zu deren Umbau und zur Dilatation der Gefäßwände. Der intervillöse Raum füllt sich mit Blut, wodurch es zu einem Stoffaustausch zwischen Mutter und Feten kommt (hämatotrophe Phase) (Lüllmann-Rauch, R. 2006).

Zunächst kommt es zu einer generalisierten Umwandlung der Arterienwände mit Veränderungen in der Gefäßwand. Es entstehen Vakuolen in der Endothelschicht der Gefäße und es erfolgt die Umwandlung der glatten Muskulatur, bevor die Spiralarterien invadiert werden (Craven et al. 1998).

Im Anschluss kommt es schließlich zur Invasion der extravillösen Trophoblastzellen in die mütterlichen Gefäße. Dabei werden die maternalen Endothelzellen und zum Teil auch die muskulären Zellen der Gefäßwände durch die invadierenden Zellen ersetzt. Durch diesen Vorgang wächst das Gefäßlumen auf die dreifache Größe an, wodurch der Gefäßwiderstand sinkt und der Blutfluss erheblich gesteigert wird (Hirano et al. 2002).

Durch die teilweise Umwandlung der Tunica muscularis werden die autoregulatorischen Prozesse behindert und es kommt zu einem weiteren Abfall des Gesamtgefäßwiderstandes. Der gesamte Umwandlungsprozess ist in der 18. bis 20. SSW abgeschlossen (Zhou et al. 1993).

Die Plazentation beim Menschen ist ein sehr invasiver Vorgang. Während dieser Phase kommt es zu einer ausgeprägten Invasion von Leukozyten, insbesondere von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die sich entlang des Zytotrophoblasten gruppieren. Sie produzieren Zytokine, die eine wichtige Rolle für die Angiogenese und vaskuläre Stabilität spielen, unter anderem vascular endothelial growth factor (VEGF) und placental growth

factor (PIGF). Auf der anderen Seite haben NK-Zellen die Aufgabe, Fremdgewebe anzugreifen und zu phagozytieren. Um dies zu verhindern, darf der Synzytiotrophoblast nicht als fremd erkannt werden (Sibai et al. 2005).

Um dem entgegen zu wirken, exprimiert der Synzytiotrophoblast keine HLA-Moleküle, mit Ausnahme des vom Vater stammenden HLA-C. Dieses schützt den Synzytiotrophoblasten vor den NK-Zellen, stimuliert allerdings eine Population von uterinen NK-Zellen, die maßgeblich an dem Umbau der Spiralarterien beteiligt sind, indem sie Interferon- γ (IFN- γ) produzieren. IFN- γ führt wiederum zur Aktivierung von Genen, die unter anderem Proteasen und Zytokine stimulieren. Die hieraus resultierende Vasodilatation läuft vermutlich über die lokale Bindung von VEGF ab, obwohl auch andere Mechanismen wie die Stimulation der NO-Oxidase in Betracht gezogen werden müssen (Croy et al. 2003, Sibai et al. 2005).

Zhou et al. haben gezeigt, dass nach der Umformung der Spiralarterien von den Trophoblastzellen ein Adhäsionsmolekülphänotyp exprimiert wird, der dem der Endothelien ähnelt. Durch die Störung der vaskulären Autoregulation der mütterlichen Gefäße kommt es zu einer Hyperperfusion der Spiralarterien. Während dieser frühen Phase der Plazentation scheinen die Zytotrophoblasten als Klappen zu dienen, die den Blutzufuss zum Feten kontrollieren (Zhou et al. 1997).

Durch die initial physiologisch auftretende Ischämie wird der hypoxia inducible factor 1 α induziert, worauf hin es zu vermehrter Angiogenese und Exprimierung von Wachstumsfaktoren, besonders dem insulin-like growth factor, kommt (Sibai et al. 2005). Die so abgelaufene Angiogenese trägt unter anderem zum Entstehen der reifen Plazenta bei, die den Feten bis zur Geburt am Leben hält.

1.1.7 Pathophysiologie der Präeklampsie

Die Hypothesen über den Pathomechanismus der Präeklampsie lassen sich in zwei Kategorien einteilen: zum einen den immunologischen Ansatz und zum anderen den vaskulären Ansatz, bei dem vor allem die Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle spielen. Da sich die Theorien zum Teil ergänzen, kann man sie nicht vollständig voneinander trennen.

Bei der immunologischen Hypothese geht man davon aus, dass die Spermienexposition im Uterus zu einer Inflammation führt. Ein kritischer Faktor ist der seminal-vesicle-derived transforming growth factor β 1 (TGF β 1), der paternale Antigene prozessiert und zu einer Typ 2 Immunreaktion führt. Auf der anderen Seite führt TGF β 1 zu einer Unterdrückung der allergischen Typ 1-Reaktion, wodurch eine Semiallograft-Reaktion gegen den Feten verhindert wird (Robertson et al. 2002).

Während der Plazentation invadieren die Zellen des Zytotrophoblasten die Spiralarterien der Mutter. Um eine Reaktion des Immunsystems zu verhindern, verändert der Zytotrophoblast seinen eigentlichen Phänotyp von Adhäsionsrezeptoren und imitiert den Phänotyp von vaskulärem Endothel (Zhou et al. 1997).

Generell geht man davon aus, dass die Präeklampsie eine immunogene Antwort der Mutter auf die Plazentation darstellt. Eine unzureichende Plazentation ist prädisponierend für die Präeklampsie, kann aber nicht die alleinige Ursache sein. Wäre dies der Fall und die Präeklampsie würde nur auf einer Ischämie beruhen, würden die Symptome bei Mutter und Fetus ähnlicher ablaufen. Zusätzlich ist die Rate von IUGR bei den Feten nicht wesentlich höher als bei normal verlaufenden Schwangerschaften (Redman et al. 1999).

Gekennzeichnet ist die Präeklampsie durch eine inflammatorische Reaktion der Mutter auf die Schwangerschaft, die in der Regel ab der 20. Schwangerschaftswoche nachweisbar ist. Diese ist in geringem Maße auch bei gesunden Schwangeren initial als physiologisch anzusehen (Sargent et al. 2003).

Eine der gängigsten Theorien zur vaskulären Genese beruht auf einer gestörten Trophoblastinvasion in die Spiralarterien mit nachfolgender Mangeldurchblutung der Plazenta. Dadurch kommt es zu Hypoxie und Ischämie der Plazenta und der Gefahr einer vorzeitigen Ablösung.

Es kommt zu einer unzureichenden Umwandlung der Spiralarterien mit verminderter Durchwanderung des Myometriums und der vermehrten Persistenz von glatten Muskelzellen und elastischen Fasern. Diese abnorme Gefäßentwicklung führt zu einem erhöhtem Gefäßwiderstand, verstärkter Thrombozytenaggregation und endothelialer Dysfunktion (Brosens et al. 2003). Es wird angenommen, dass es in diesem Rahmen zu Ischämien der Plazenta kommt, welche durch einen Wechsel zwischen Hypoxie und Reoxygenierung zu einem vermehrten oxydativen Stress und zur Freisetzung von freien Radikalen führt, wobei in vivo keine sichere Hypoxie im intervillösen Raum nachgewiesen werden konnte (Hung, T.H., Burton, G.J. 2006).

Nach neueren Thesen scheint ein wichtiger Faktor für die Pathophysiologie der Präeklampsie ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren zu sein. Taylor et al. konnten 2003 einen verminderten und verzögerten Anstieg vom proangiogenetischen placental growth factor nachweisen.

Im Kontrast dazu konnte gezeigt werden, dass antiangiogenetische Faktoren wie die fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) bei Präeklampsie erhöht sind und es zu einer Blockade von VEGF kommt (Venkatesha et al. 2006). Des Weiteren wiesen im Tierversuch Ratten, die mit einem sFLT-1-exprimierenden Adenovirus infiziert waren, präeklampsieähnliche Symptome auf (Maynard et al. 2003). Entsprechend hat der sFlt/PlGF-Quotient derzeit einen wichtigen Stellenwert in der klinischen Diagnostik.

Ein weiterer möglicher Faktor ist die Beteiligung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Bei der Präeklampsie sind das zirkulierende Blutvolumen sowie der kardiale Auswurf vermindert, der periphere Gefäßwiderstand dagegen erhöht. Als Folge kommt es zu einer verminderten Aktivierung des RAAS. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein erhöhtes Ansprechen auf Angiotensin-II zu finden ist. Bei Schwangeren mit Präeklampsie ließen sich ab der 20. SSW agonistische Antikörper gegen eine der extrazellulären Schleifen des Angiotensin-1-Rezeptors (AT1-AA) nachweisen, die nach der Entbindung wieder verschwanden. In vitro generieren die AT1-AA reaktive Sauerstoffspezies in glatten Muskelzellen und Trophoblasten über die NADPH-Oxidase, was pathophysiologisch möglicherweise zu einer Endothelschädigung beitragen könnte (Verdonk et al. 2014).

Die erhöhten Blutdruckwerte lassen sich pathophysiologisch durch eine erhöhte Sympathikusaktivierung sowie durch ein stärkeres Ansprechen auf Vasokonstriktoren erklären. Bei normal verlaufender Schwangerschaft sinkt der Blutdruck durch die Gefäßweitstellung und den Abfall des systemischen Gefäßwiderstandes. In der Niere kommt es zu einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) durch eine verminderte Fenestrierung der glomerulären Basalmembran. Im Verlauf kommt es zu einer Proteinurie und zum anderen einer Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS). Durch die Wasserretention und den Albuminabfall kommt es zu Ödemen, die von vielen Patientinnen mit Präeklampsie besonders im Gesicht, prätibial und an den Händen beschrieben werden (Baumwell, S., Karumanchi, S. A. 2007).

Zelladhäsionsmoleküle spielen bei der Implantation, Plazentation und der Entwicklung des Fetus eine wichtige Rolle. Sie nehmen direkt oder indirekt Einfluss auf die Zellwanderung, Zellteilung, das Wachstum und die Angiogenese.

Letztlich ist trotz aller Theorien die genaue Ursache für die Entwicklung einer Präeklampsie nicht sicher geklärt.

1.1.8 Adhäsionsmoleküle in der Schwangerschaft

Unter Zelladhäsionsmolekülen versteht man eine Gruppe von Membranproteinen, welche Zell-Zell Kontakte und Kontakte zur extrazellulären Matrix nach dem Rezeptor-Ligand-Prinzip vermitteln. Des Weiteren ermöglichen sie zum Teil die Signaltransduktion und haben inflammatorische und immunologische Funktion. Die Hauptgruppen sind die Integrine, Cadherine, Selektine und die Ig-Superfamilie. Die lösliche Form von Adhäsionsmolekülen ist bei vielen Erkrankungen in veränderter Form im Serum nachweisbar (Lüllmann-Rauch, R. 2006).

Während der Schwangerschaft ändern die Trophoblasten ihr Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen, um in das mütterliche Gewebe einzuwachsen. Dabei verhalten sie sich wie ein invasiv wachsender Tumor und verdrängen das umliegende Gewebe. Durch die Störung der vaskulären Autoregulation der mütterlichen Gefäße kommt es zu einer Hyperperfusion der Spiralarterien. Dieser Vorgang ist bei der Präeklampsie gestört.

Die bedeutendsten Adhäsionsmoleküle in diesem Zusammenhang sind die Integrine, das vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) und intercellular adhesion molecule (ICAM). Auch das epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) scheint hier eine Rolle zu spielen, auch wenn diese bisher noch nicht hinreichend geklärt ist.

Integrine verbinden den Zytotrophoblasten mit der extrazellulären Matrix der Dezidua, um so eine stabile Verbindung zu schaffen. Die Integrine verändern sich mit dem Menstruationszyklus und zeigen in der folliculären und lutealen Phase andere Muster, um sich auf die Einnistung der Eizelle vorzubereiten. Während der Schwangerschaft wird ein spezielles Integrinmuster aufrechterhalten, das die Verankerung der Blastozyste an der Uteruswand und die Invasion des Trophoblasten unterstützt (Pafilis et al. 2007).

Normalerweise wandert der Zytotrophoblast bis in das innere Drittel des Myometriums und die Arterien verdicken sich. Bei der Präeklampsie allerdings zeigten sich eine deutlich weniger tiefe Invasion des Zytotrophoblasten in das mütterliche Gewebe und ebenso eine verminderte Anzahl von Gefäßen. Bei der mikrobiologischen Untersuchung ließen sich andere Zusammensetzungen der Integrinmuster nachweisen, besonders in den α - und β -Untereinheiten (Zhou et al. 1993).

Der Zytotrophoblast verändert sein Rezeptormuster vom epithelialen Typ zum vaskulären Typ, um eine Umwandlung der Gefäße zu ermöglichen. Dies findet zum Teil auch bei der Präeklampsie statt, allerdings erfolgt dies nur eingeschränkt und die Verankerung zwischen den fetalen Zellen und den maternalen Gefäßen ist instabil. Es konnte nachgewiesen werden, dass besonders VCAM-1 und VE-Cadherine herunterreguliert waren (Zhou et al. 1997).

Ein weiteres Adhäsionsmolekül der Plazentation ist ICAM-1. Es wird besonders auf den dezidualen Endothelzellen und der Dezidua parietalis exprimiert. Zusätzlich findet man es noch auf dem endovaskulären Trophoblasten. Der Ligand ist lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1), welcher nicht vom Trophoblasten, sondern von lymphozytären Zellen exprimiert und durch inflammatorische Prozesse stimuliert wird. Die Rolle von ICAM-1 ist für die Plazentation noch nicht abschließend geklärt (Burrows et al. 1993).

Bei der normalen Schwangerschaft ist der Anteil von exprimiertem ICAM-1 relativ gering oder auch komplett nicht nachweisbar. Bei der Präeklampsie ist die Expression von ICAM-1 deutlich erhöht, besonders im endovaskulären Trophoblasten. Beobachtet

werden eine deutliche Verringerung der Spiralarterien und ein erhöhter Anteil an Makrophagen und Lymphozyten. ICAM-1 wird besonders durch $\text{TNF}\alpha$ als Marker für eine inflammatorische Reaktion weiter stimuliert (Abe et al. 2008).

Die Rolle von EpCAM bei der Schwangerschaft ist bisher nur teilweise untersucht. Bei Ratten konnte nachgewiesen werden, dass EpCAM im Endothel des Uterus durchaus nachweisbar ist und unmittelbar vor einer vorbestehenden Implantation herunterreguliert wird, um die Zellverbände vor Aufnahme der Blastozyste aufzulockern. Man kann davon ausgehen, dass EpCAM in der Zelladhäsion im Uterus sowie bei der Implantation eine wichtige Rolle spielt (Poon et al. 2014).

Somit wäre auch naheliegend, dass EpCAM an der Entstehung einer Präeklampsie beteiligt sein könnte.

1.2 Adhäsionsmoleküle

1.2.1 Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)

Das Intercellular Adhesion Molecule 1, auch als ICAM-1, BB2, CD54 oder P3.58 bezeichnet, ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches calcium- und magnesiumabhängig Zelladhäsionen vermittelt. Man findet es besonders häufig auf der Oberfläche von vaskulärem Endothel, Lymphozyten und Makrophagen.

Es handelt sich um ein einsträngiges Protein, dessen Gen auf Chromosom 19, Abschnitt 19p13.3-p13.2, lokalisiert ist (Rothlein et al. 1986).

Das Protein umfasst 505 Aminosäuren und weist zahlreiche Glykosylierungen auf. Es ist aus fünf Domänen aufgebaut und hat als Hauptelement die β -Faltblattstruktur. Der Aminoterminus umfasst die extrazelluläre Domäne, die durch zahlreiche Disulfidbrücken in eine schlingenförmige Konformation gebracht wird. Hier werden an den beiden Hauptdomänen D1 und D2 die Moleküle lymphocyte function associated antigen (LFA-1) und das macrophage antigen 1 (MAC 1) gebunden. Es folgen eine einzelne transmembranöse Domäne und eine am carboxyterminalen Ende gelegene zytoplasmatische Domäne. Das ICAM-1 wird zur Familie der Immunglobulin-Superfamilie gezählt (Bella et al. 1998).

Der Signalweg von ICAM-1 wird über Calcium vermittelt. Bella et al haben 1998 dies vorwiegend an Astrozyten getestet und hierbei zwei Signalwege gefunden, die für ICAM-1 typisch zu sein scheinen. Dies ist zum einen der cAMP/PKA-Signalweg, über den durch eine Überexpression von cAMP die Proteinkinase A aktiviert wird, welche eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB bewirkt. Der zweite Weg ist der Erk-Signalweg. Hier erfolgt zunächst eine Aktivierung der Proteinkinase C, welche dann über

das kleine G-Protein Raf die Proteinkinase MEK aktiviert, die wiederum Erk-2 aktiviert. Bei beiden Signalwegen kommt es zu einer Aktivierung von CREB und einer Hochregulation der Genexpression von TNF- α . Dies bestätigt die Rolle von ICAM-1 bei inflammatorischen Prozessen.

Diese wird auch durch andere Experimente bestätigt. Bei Patienten mit Nahrungsmittelallergie gegen verschiedene Getreideprodukte wurde eine deutlich erhöhte ICAM-1 Produktion festgestellt. Diese fand sich vorwiegend in den Zellen der subepithelialen Mucosa der Dünndarmschleimhaut, die bei diesen Patienten starke Zeichen der Entzündung aufwies (Veres et al. 2001).

Die eigentliche Funktion von ICAM-1 ist die Initialisierung der junktionalen und nicht-junktionalen Leukozytendiapedese durch Gefäßendothelien, d.h. die Durchwanderung der Gefäßmembran, um vom Blutstrom den Ort der Entzündung zu erreichen.

Unter soluble ICAM (sICAM) versteht man die abgespaltenen fünf extrazellulären Domänen von ICAM, die man mit einem ELISA bestimmen kann.

Die genaue Funktion von sICAM ist bisher nicht abschließend geklärt, jedoch gibt es verschiedene Spekulationen über potentielle Funktionen. So konnte gezeigt werden, dass sICAM eine wichtige Rolle bei der Migration von glatten Muskelzellen in Gefäßen spielt und somit eine potentielle Rolle bei der Entwicklung der Hypertonie (Lee et al. 2008).

Außerdem war bei Zellkulturen, die mit sICAM inkubiert wurden, eine deutlich erhöhte Proliferation von T-Zellen zu beobachten, sowie eine erhöhte Konzentration von TNF α , was für eine Rolle von sICAM bei entzündlichen Prozessen spricht (McCabe et al. 1993).

Analog dazu zeigten Schmal et al. 1998, dass sICAM in alveolären Makrophagen eine Produktion von TNF α und macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) anregt und somit zu einer vermehrten Ablagerung von Immunkomplexen in den Alveolen bei Lungenverletzungen führt.

Zusätzlich ist sICAM bei einigen Erkrankungen in veränderter Konzentration nachweisbar. Bei unbehandelter Zöliakie sind im Blut deutlich erhöhte Konzentrationen von sICAM und Interleukin 18 (IL-18) messbar, die sich bei erfolgreicher Behandlung wieder zurückbilden (Merendino et al. 2003).

Außerdem findet man besonders bei entzündlichen neurologischen Erkrankungen wie aktiver Multipler Sklerose und aktivem Guillain-Barré-Syndrom deutlich erhöhte Serumkonzentrationen von sICAM. Diese sind nach Behandlung mit Kortikosteroiden nicht mehr nachzuweisen. Auch bei nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen zeigten sich kleine Veränderungen der sICAM-Konzentration (Trojano et al. 1998).

Bereits 1993 zeigten Heufelder und Bahn, dass bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen wie beim M. Basedow und der Hashimoto-Thyreoiditis die Schwere der Erkrankung mit der Serumkonzentration von sICAM korreliert. Besonders

hohe Werte fanden sich bei Patienten mit endokriner Ophthalmopathie. (Heufelder A.E., Bahn, R.S. 1993).

In einer neuen Arbeit wurde die Rolle von sICAM bei septischen Patienten auf Intensivstationen untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Sepsis sICAM im Blut gegenüber nicht-septischen Patienten deutlich erhöht ist (Kjaergaard et al. 2016).

Auch im Bereich der Tumorerkrankungen spielt sICAM eine Rolle. Bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom wurden die Serumwerte für sICAM mit gesunden Rauchern und Nichtrauchern verglichen. Es stellte sich heraus, dass bei den Patienten mit manifester Tumorerkrankung deutlich erhöhte sICAM-Konzentrationen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe gemessen werden konnten. Des Weiteren gab es einen weiteren Serumanstieg bei metastasierter Erkrankung (Grothey et al. 1998).

Die sICAM Veränderungen bei Präeklampsie werden von verschiedenen Autoren widersprüchlich beschrieben. Wie im Verlauf noch dargestellt wird, hat man Konzentrationsab- und -zunahmen sowie unveränderte Konzentrationen nachgewiesen.

Zusammenfassend sprechen die bisherigen Daten dafür, dass sICAM besonders bei autoimmunen und entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Da die Präeklampsie ebenfalls mit entzündlichen Prozessen einhergeht, ist es durchaus möglich, dass sICAM hier ebenso wie bei den vorherigen Beispielen eine wichtige Rolle spielt.

1.2.2 Epithelial Cellular Adhesion Molecule (EpCAM)

Das Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) ist ein 40 kDa schweres Glycoprotein, welches Calcium-unabhängige Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion vermittelt, daher wird es mittlerweile zu den Adhäsionsmolekülen gezählt (Litvinov et al. 1997).

Das codierende Gen für EpCAM ist das TACSTD1-Gen (früher GA733-2 Gen), welches 14 kb umfasst und auf dem langen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert ist. Zwischen Mensch und Maus besteht eine Homologie von ca. 82 %, was bedeutet, dass das Gen in der Evolution hoch konserviert ist (Balzar et al. 1999).

Das Molekül an sich ist ein 314 Aminosäuren umfassendes Polypeptid mit zahlreichen Glykosylierungen. Es wird besonders an den basolateralen Zellmembranen exprimiert und ist aus einer extrazellulären, einer zytoplasmatischen und einer intrazellulären Domäne aufgebaut. Die extrazelluläre Domäne ist besonders immunogen und bindet verschiedene Antikörper wie zum Beispiel 17-1A, 323/A3, KS1/4, GA733, MOC31 und viele weitere. Die cysteinreiche Domäne enthält zwei EGF-like repeats, einen thyroglobulin repeat und eine kleine Domäne mit Ähnlichkeit zu Nidogen (Litvinov 1994).

Beide EGF-like repeats werden für eine stabile Zell-Zell-Adhäsion benötigt. Das erste EGF-like repeat vermittelt eine reziproke Interaktion zwischen den EpCAM-Molekülen. In der nativen Form liegen hier Dimere und Tetramere vor. Das zweite EGF-like repeat vermittelt die Adhäsion zwischen den Zellen (Balzar et al. 2001).

Die intrazelluläre Domäne besteht aus 23 hydrophoben Aminosäuren und dient der Internalisation. Bei der Zellverbindung zwischen den EpCAM-Molekülen spricht man von einer homophilic cell adhesion, die eine schwächere Verbindung darstellt als bei den Cadherinen (Balzar et al. 2001).

In Zellverbänden mit Cadherin-vermittelten Zellverbindungen verursachte eine vermehrte Exposition von EpCAM eine Auflösung dieser Verbindungen in Abhängigkeit von der EpCAM-Konzentration. Im Verlauf konnte stattdessen eine Zunahme der EpCAM-vermittelten Verbindungen nachgewiesen werden. Dabei hatte EpCAM anscheinend keinen direkten Einfluss auf die Cadherine, aber auf die Bindung an das Zytoskelett (Litvinov et al. 1997).

Zusätzlich scheint EpCAM direkte Verbindungen mit dem aktinbasierten Zytoskelett über die intrazelluläre Domäne einzugehen (Balzar et al. 1998).

Im Jahr 2008 ist es Maetzel et al. gelungen, die genaue Signalkaskade für EpCAM zu entschlüsseln:

Die Signaltransduktion läuft über die initiale proteolytische Spaltung durch das TNF- α converting enzyme (TACE) und Presenilin-2 (PS-2) ab. Die abgespaltene intrazelluläre Domäne (EpICD) von EpCAM hat stark proliferative Eigenschaften, was über den Proliferationsmarker Ki67 nachgewiesen wurde. EpICD bindet an das „four and a half LIM domain“ Protein 2 (FHL2), welches ein Coaktivator von β -Catenin ist. Der Komplex aus EpICD, FHL2 und β -Catenin wandert in den Zellkern und FHL2 verbindet EpICD mit spezifischen DNA-Sequenzen und dem Regulator „lymphoid enhancing binding factor“ (Lef-1). Darüber wird eine vermehrte Expression von c-myc und e-fabp initiiert und die Zellproliferation beschleunigt. Die abgespaltene extrazelluläre Domäne (EpEX) von EpCAM bildet einen auto- und parakrinen Liganden, der die Produktion von EpICD in einem positiven Feedback weiter erhöht. Zusätzlich wird über EpEX auch die intramembranöse Spaltung und Freisetzung von EpICD über Presenilin 2 initiiert (Maetzel et al. 2009).

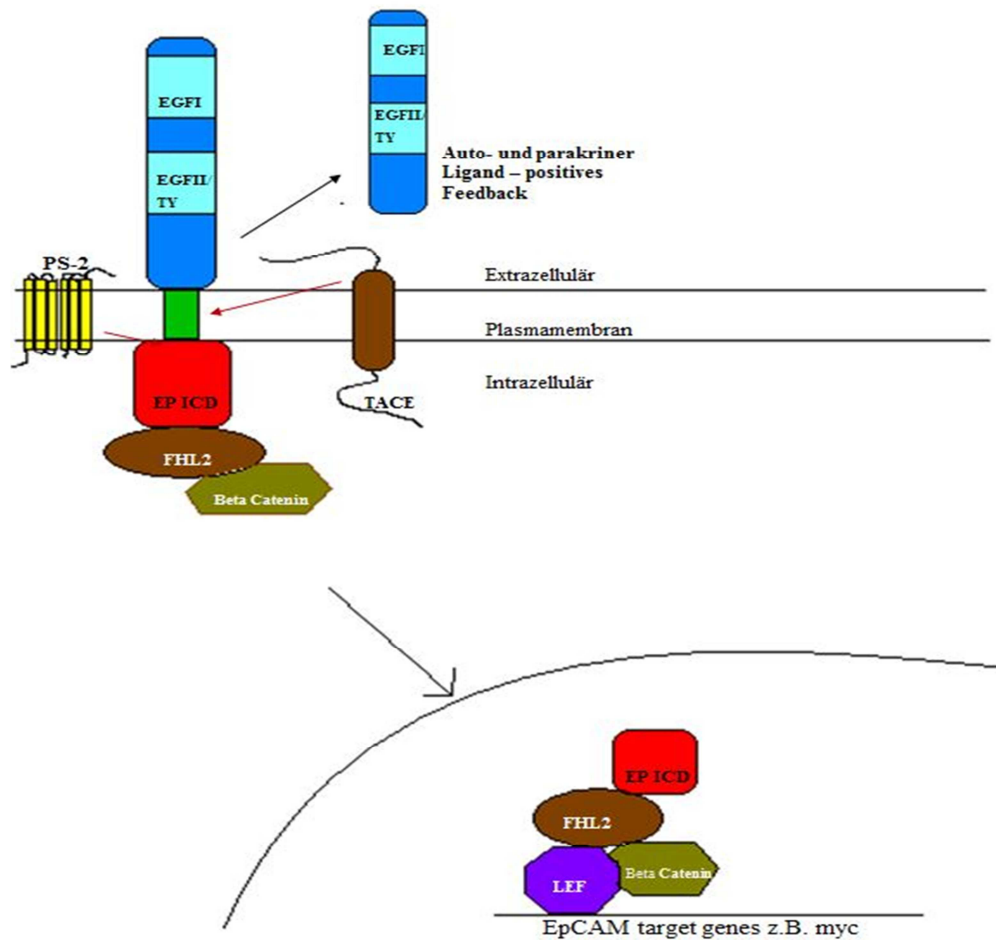


Abbildung 2: Signalkaskade EpCAM nach Maetzel et al. 2009

Die vermehrte Expression von EpCAM bewirkt eine Hochregulation des Protoonkogen c-myc, was zu einer vermehrten Zellproliferation führt (Münz et al. 2004).

Neben der Funktion als Adhäsionsmolekül ist EpCAM typischerweise insbesondere bei epithelialen Tumoren, z. B. Karzinomen, aber nicht auf mesodermalen oder neurogenen Tumoren zu finden (Momburg et al. 1987).

Maetzel et al. konnten 2008 nachweisen, dass bei Mäusen, denen EpCAM und EpICD injiziert wurde, innerhalb von wenigen Wochen solide Tumore gewachsen sind. Selbst eine alleinige Injektion von EpICD konnte ein Tumorstadium induzieren (Maetzel et al. 2009).

Eine Überexpression von EpCAM konnte bereits im Tumorgewebe von Lungen-, Ösophagus-, Magen- und Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Dabei bestand ein direkter Zusammenhang zwischen einer hohen lokalen Expression von EpCAM und einem aggressiven und invasiven Tumorstadium und einem schlechteren Überleben (Baeuerle et al. 2007).

Die Überexpression auf Karzinomen macht EpCAM zu einem potenziellen Ziel für die Therapie mit monoklonalen Antikörpern. So wurde beispielsweise der therapeutische Antikörper Catumaxomab zur Therapie des malignen Aszites bei Ovarialkarzinomen zugelassen (Burgess et al. 2007).

Weiterhin scheint EpCAM eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen zu spielen. Bei Leberentzündungen konnte eine de-novo Expression von EpCAM auf Hepatozyten bei chronisch entzündlichen Prozessen nachgewiesen werden (Breuhan et al. 2006).

Während der Embryonalentwicklung des Menschen ist die Konzentration von EpCAM in Niere, Leber, Pankreas, Haut und in den Keimzellen besonders hoch. Zusätzlich scheint EpCAM eine besondere Bedeutung bei der Lungenreifung zu spielen (Kasper et al. 1995). Bei Erwachsenen ist die Verteilung deutlich unterschiedlich. Hier findet man EpCAM nur an den basolateralen Membranen der Epithelien. Besonders hoch ist Expression von EpCAM im Kolon und in den Pankreas- und Gallengängen.

Bei Frauen kann man des Weiteren eine hohe Expression von EpCAM am Ovar, an der Tube sowie im Uterus finden. Man vermutet, dass hohe EpCAM-Expression auf eine starke Zelladhäsion der Tumorzellen hinweist und somit eine Metastasierung einzelner Zellen entweder erschwert oder völlig verhindert wird (Balzar et al. 1999).

Welche Rolle EpCAM bei der Plazentation spielt, ist bisher nicht hinreichend geklärt. Die oben beschriebenen Effekte lassen vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Plazentaentwicklung und der Expression von EpCAM besteht. Da für EpCAM besonders stabile Zellkontakte nachgewiesen werden konnten und es in Embryonalgewebe vermehrt exprimiert wird, scheint es für eine normale Entwicklung des Feten während der Schwangerschaft von Bedeutung zu sein. Man kann vermuten, dass bei einer verminderten Expression von EpCAM die Plazentation und das fetale Outcome negativ beeinflusst werden können.

Im Jahr 2009 haben Nagao et al. Experimente mit EpCAM Knock-out-Mäusen durchgeführt und den Einfluss auf die Schwangerschaft und die Embryonalentwicklung beobachtet. Die Knock-out-Mäuse hatten auf dem TACSTD1 Gen ein beschädigtes Exon 2, wodurch die Expression von EpCAM verhindert wurde.

Die Mäuse wiesen während der Schwangerschaft eine schlechte Plazentaentwicklung mit mangelnder Angiogenese auf. Auch die Entwicklung des Trophoblasten war deutlich gestört. Die Mäuse in der Kontrollgruppe mit normaler Plazentation zeigten hohe EpCAM Expression in der Allantois, der labyrinthine layer, am Synzytiotrophoblasten und an den intervillösen Gefäßen. Bei den Knock-out-Mäusen zeigten sich in den schlecht ausgebildeten Gefäßen eine Hyperkoagulabilität sowie die Neigung zu Mikrothromben mit nachfolgender Mangeldurchblutung.

In der Kontrollgruppe zeigte sich die zu erwartende Beteiligung von EpCAM bei der Entwicklung von Darm, Lunge, Pankreas, Niere und den Augen. Die Nachkommen der heterozygoten Mäuse wiesen keinerlei Veränderungen auf und ließen sich nur genetisch vom Wildtyp unterscheiden. Bei den homozygoten Knock-out-Mäusen verlief die Entwicklung bis zum neunten Tag normal, danach trat eine Entwicklungsverzögerung auf und nach dem 12,5. Tag war keine weitere Entwicklung mehr nachweisbar, die Feten sind abgestorben.

Eine Untersuchung der Embryonen ergab eine deutliche Entwicklungsverzögerung mit Wachstumsretardierung und unvollständigem Neuralrohrschluss. Des Weiteren gab es auch Fehlentwicklungen des Magen-Darm-Traktes, der Augen und der Ohren. Auch die Bronchialbögen waren nicht vollständig entwickelt (Nagao et al. 2009).

Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass bei Ratten die Expression von EpCAM im Uterus vor der Implantation der Blastozyste herunterreguliert wird (Poon et al. 2014).

In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass EpCAM für eine physiologische Plazentation eine große Rolle zu spielen scheint. Damit wäre es interessant zu untersuchen, ob EpCAM ebenfalls bei der Präeklampsie eine bedeutende Rolle spielt und gegebenenfalls auch als diagnostischer Parameter eingesetzt werden kann.

Die Funktion der löslichen Form des Moleküls (sEpCAM) ist bisher noch weitgehend unklar. Mehrere Studien haben sich bereits mit der möglichen Funktion von sEpCAM befasst.

Beispielsweise ist sEpCAM bei verschiedenen Karzinomen und bei Patienten mit Hepatitis B und C in erhöhter Konzentration nachweisbar (Abe et al. 2002).

Bei malignem Aszites konnte eine deutlich erhöhte Konzentration von sEpCAM im Aszites nachgewiesen werden, ein besonders starker Zusammenhang bestand bei Ovarialkarzinomen. Zusätzlich war ein positiver Nachweis von sEpCAM mit einem signifikant schlechteren Überleben verbunden (Seeber et al. 2015a).

Des Weiteren konnte in einem in vitro Experiment nachgewiesen werden, dass sEpCAM eine schlechtere Wirksamkeit von Catumaxomab bewirkt (Seeber et al. 2015b). Dies zeigt, dass auch die lösliche Form von EpCAM als Antigen möglicherweise eine Wirkung zeigt, in dem es z. B. Antikörper binden und in ihrer Funktion abschwächen kann. Damit ist sEpCAM nicht nur als Abfallprodukt im Spaltprozess anzusehen, sondern als klinisch bzw. funktionell relevantes Molekül.

Für die Präeklampsie gibt es noch keine Daten, da aber eine verminderte Konzentration von EpCAM während der Implantation beschrieben wurde, wäre möglicherweise über eine veränderte Serumkonzentration von sEpCAM während der Schwangerschaft zu spekulieren. Da die Präeklampsie mit einer gestörten Plazentation einhergeht und Nagao

et al. 2009 eine gestörte Plazentation bei EpCAM-Knock-out-Mäusen beschrieben haben, ist hier ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Expression von EpCAM und der Präeklampsie zu vermuten. Eine verminderte Expression von EpCAM könnte eine schlechtere Zelladhäsion innerhalb der Plazenta bewirken, da in der Studie eine erhöhte Expression von EpCAM am Synzytiotrophoblasten gezeigt wurde. Eine Plazentationsstörung mit konsekutiver Plazentainsuffizienz wäre ein möglicher Effekt. Weiterhin kann EpCAM an der mangelhaften Umformung der Spiralarterien beteiligt sein. Da, wie Balzar et al 1999 beschrieben haben, eine hohe Homologie zwischen dem Gen bei Mäusen und beim Menschen besteht, ist es sinnvoll zu untersuchen, ob die Erkenntnisse, die in den Studien am Mausmodell gewonnen wurden, auch auf den Menschen übertragbar sind und ob EpCAM somit eine wichtige Rolle bei der Präeklampsie spielt. sEpCAM ist als Spaltprodukt von EpCAM ein potentiell nachweisbarer Parameter für eine nicht-invasive Diagnostik bei Schwangeren.

1.3 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Ein Einzelnukleotidpolymorphismus (engl.: single nucleotide polymorphism; SNP) ist eine Genvariation an einer Position des Genoms, bei der nur ein Basenpaar im DNA-Strang verändert ist. Ein SNP liegt definitionsgemäß dann vor, wenn die Genvarianten mit einer Ausprägung von mindestens 1 % in einer Population vorliegen. Dies unterscheidet ein SNP von einer einfachen Punktmutation. Die Verteilung der SNPs ist ungleichmäßig im Genom verteilt. Abschnitte, die sehr replikationsfreudig sind, weisen eine höhere Konzentration an SNPs auf als Abschnitte, die wenig repliziert werden. Diese Form der Genveränderung stellt mit 90 % die häufigste Variante der Allelveränderung dar. Statistisch gesehen liegt alle 500-1000 Basenpaare ein SNP vor. Die Verteilung in ethnischen Gruppen kann dabei sehr unterschiedlich sein (Brookes, A.J. 1999).

Die Auswirkung eines SNP ist abhängig von seiner Lokalisation im DNA-Strang. In den nicht-codierenden Abschnitten hat der SNP keine Auswirkung auf die Proteinstruktur, es kann jedoch zu einer veränderten Bindung an Transkriptionsfaktoren kommen und für unterschiedliche Splicevarianten sorgen. Bei Veränderungen in den codierenden Abschnitten kann es zu einem Aminosäureaustausch (missense mutation) mit daraus resultierender Veränderung im Protein, oder zur Ausbildung eines Stopp-Codons kommen, wodurch die Translation abgebrochen wird (nonsense mutation) (Buroker, N.E. 2014).

SNPs können Assoziationen mit bestimmten Erkrankungen, Arzneimittel- und Impfstoffwirkungen und dem Metabolismus aufweisen. Demnach könnten sich durch

Bestimmung bestimmter SNPs die Wirkung eines Arzneimittels oder die Auftretenswahrscheinlichkeit einer bestimmten Erkrankung besser vorhersagen lassen. Im Gegensatz zu Erkrankungen, die nur von der Mutation in einem Gen verursacht werden, wie zum Beispiel bei der zystischen Fibrose, sind bei anderen Entitäten häufig mehrere SNPs jeweils in geringem Maße an einem erhöhten Erkrankungsrisiko beteiligt (Collins et al. 1998). Auch für eine Erkrankung wie die Präeklampsie, die familiär gehäuft auftritt, ist ein Zusammenhang mit bestimmten SNPs zu vermuten. Beispielsweise wäre durch einen SNP im Gen der Adhäsionsmoleküle eine veränderte Expression derselben denkbar.

1.3.1 Auswahl der Polymorphismen für diese Arbeit

Für die Analyse der SNPs wurden ein Polymorphismus des ICAM-1 Gens gewählt und zwei Polymorphismen des EpCAM-Gens TACSTD1.

Für den Polymorphismus rs5498 des ICAM-1-Gens wurde bereits in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen der Mutation und verschiedenen Erkrankungen gezeigt.

In einer Arbeit von Puthothu et al. (2006) konnte gezeigt werden, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen kindlichem Asthma und dem SNP gibt, zusätzlich waren in dieser Studie auch erhöhte Konzentrationen von sICAM nachgewiesen worden.

In einer italienischen Studie wurde nachgewiesen, dass die Mutation in rs5498 in einem signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten von peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) steht (Gaetani et al. 2002).

Des Weiteren wurde ein signifikanter Zusammenhang mit dem G-Allel von rs5498 und dem Auftreten und Progress bei epithelialen Ovarialkarzinomen beschrieben (Cai et al. 2013).

Iwao et al. konnten 2004 nachweisen, dass der rs5498 Polymorphismus nahe einer Spleißstelle liegt, die eine verkürzte Form von ICAM-1 (ICAM-1-S) produziert, welcher die transmembranäre und intrazelluläre Domäne fehlt. G-Allelträger haben weniger mRNA für ICAM-1-S und produzieren mehr ICAM-1-L, bei dem die transmembranäre und intrazelluläre Domäne vorhanden sind. Durch Abspaltung von membrangebundenem ICAM-1 entsteht sICAM, was die erhöhten Konzentrationen im Blut bei der Mutation erklären könnte.

In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass eine Mutation mit einer signifikant höheren Konzentration von sICAM bei Europäern assoziiert ist (Bielinski et al. 2008). Da in der Literatur erhöhte sICAM-Konzentrationen mit einem erhöhten Risiko für Präeklampsie vorbeschrieben sind, wurde dieser Polymorphismus gewählt, um zu

eruieren, ob ein direkter Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten von Präeklampsie besteht.

Für EpCAM wurden die Polymorphismen rs1421 und rs1126497 des TACSTD1-Gens gewählt.

Für rs1126497 wurden in der Literatur bereits mehrere Zusammenhänge zwischen der Mutation und dem klinischen Verlauf verschiedener Erkrankungen, besonders im Bereich der Onkologie, beschrieben. rs1126497 ist signifikant häufiger mit dem Auftreten von portalvenösen Thrombosen bei hepatozellulärem Karzinom vergesellschaftet (Yu et al. 2014). Weiterhin konnte in China gezeigt werden, dass die Allelvarianten CT und TT eine signifikant erhöhte Mortalität bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom hatten. Zusätzlich bestand auch ein erhöhtes Rezidivrisiko bei diesen Patienten (Yang et al. 2014).

Jiang et al. konnten 2010 in einer Arbeit nachweisen, dass bei rs1126497 ein signifikanter Zusammenhang zwischen T-Allelträgerinnen und dem Auftreten von Mamma-Karzinomen bestand. Die Karzinome traten bei Patientinnen mit CT oder TT nicht nur häufiger, sondern auch früher auf.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Trägerinnen des T-Allels ebenfalls ein erhöhtes Risiko haben, ein Zervixkarzinom zu entwickeln. Dabei besteht ein signifikanter Gen-Dosis-Effekt sowohl mit der Invasivität des Karzinoms als auch mit der Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung (Hu et al. 2012).

Für den TACSTD1-Polymorphismus rs1421 konnte in den vier Studien kein Zusammenhang zwischen der Mutation und dem Erkrankungsrisiko für Karzinome gefunden werden. Zuletzt wurde jedoch in einer Studie beschrieben, dass die Mutation in Zusammenhang mit einem geringeren progressionsfreien Überleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom steht (Heubner et al. 2015).

Zusammenfassend wurden bei beiden Polymorphismen Assoziationen mit gynäkologischen Krankheitsbildern wie Ovarial-, Brust- und Mamma-Karzinom beschrieben. Ob auch ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Präeklampsie besteht, ist bisher nicht untersucht worden. Daher wurden diese beiden Polymorphismen des EpCAM codierenden Gens TACSTD1 für die Analyse ausgewählt.

1.4 Fragestellung dieser Arbeit

Für die Präeklampsie gibt es bisher keine Vorhersagemethode, die mit hoher Sensitivität eingesetzt werden kann, um gefährdete Patientinnen frühzeitig zu erkennen. Lediglich die

sFlt-1/PIGF-ratio wird laborchemisch bisher genutzt, um eine Präeklampsie vorherzusagen.

Wie bereits beschrieben spielen Adhäsionsmoleküle bei der normalen Plazentation eine wichtige Rolle. Somit lässt sich vermuten, dass bei einer gestörten Plazentation wie bei der Präeklampsie, die Adhäsionsmoleküle ebenfalls einen erheblichen Stellenwert haben. Gegenstand dieser Arbeit ist es daher, die bereits gewonnenen, teils sehr unterschiedlichen Ergebnisse zu sICAM zu reevaluieren und als möglichen neuen Ansatz für die Früherkennung zu testen. Zusätzlich soll das epitheliale zelluläre Adhäsionsmolekül (EpCAM) beziehungsweise dessen lösliche Form sEpCAM in seiner potentiellen Rolle bei der Entstehung der Präeklampsie evaluiert werden, was bisher in dieser Form nicht untersucht worden ist.

Zusätzlich soll evaluiert werden, ob die beschriebenen Polymorphismen im ICAM-Gen und im TACSTD1-Gen einen Einfluss auf die Entwicklung einer Präeklampsie haben und/oder einen Einfluss auf die Konzentration löslicher Adhäsionsmoleküle im Serum haben.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte

- Abzug BioFlow Technik
- Autoklav der Firma Varioklav
- Brutschrank der Firma Memmert
- DNA Mini Kit QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit 51306
- Erlenmeyerkolben der Firma Rasotherm
- Feinwaage LA620S von Sartorius
- Gefrierschrank (-80°C) der Firma Heraeus
- Gel-Dokumentationssystem der Firma INTAS
- Glasflaschen 500 ml Duran von Schott
- Magnetrührer MR 3002 von Heidolph
- Mikrotiterplatten
- Multikanalpipette (100-1200 µl) Finnpipette® von Thermo Scientific
- Multipipette Finnpipette® von Labsystems
- Netzgeräte Bio-Rad, Consort, Appligene oncor, ELVI 18, LKB Macrodrive
- pH-Meter von Schott instruments
- Pipette 2-20 µl von eppendorf Reference
- Pipette 10-1000 µl von eppendorf research
- Pipettenspitzen (1-200 µl) Nr. 2113602 von ratiolab
- Pipettenspitzen (100-1000 µl) Nr: 2113612 von ratiolab
- Plate Covers
- Plattenleser mit 450 nm Hauptfilter und 620 nm Korrekturfilter Sunrise von Tecan
- Schüttler mit 300 ± 50 rpm MTS4 von IKA
- sEpCAM ELISA Kit BioVendor No. RD194024100R
- sICAM-1/CD54 ELISA Kit Quantikine® Human sICAM-1/CD54 Immunoassay Catalog Number SCD540
- Thermocycler der Firma Biometra (Uni, Uno2, TGradient)
- Vortex Gerät Reaxtop von Heidolph
- Waage R160P von Sartorius
- Wasserbadheizung HC von Julabo

- Zentrifuge Biofuge fresco von Heraeus

2.1.2 Chemische Reagentien und biologisches Material

Das verwendete Serum stammt von 48 Patientinnen der Klinik für Geburtshilfe mit klinisch gesicherter Präeklampsie, sowie 35 nicht erkrankten Patientinnen als Kontrollgruppe. Alle Patientinnen waren aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis. Ein Ethikantrag wurde bei der Ethikkommission des Universitätsklinikums Essen gestellt und bewilligt (Antragsnummer 08-3684).

Human sICAM-1/CD54, Quantikine®, R&D Systems Catalog Number SCD540

- sICAM-1 Conjugate
- sICAM-1-Standard
- Calibrator diluent RD5-7
- Wash Buffer Concentrate
- Color Reagent A
- Color Reagent B
- Stop solution – 2 N Schwefelsäure
- Aqua dest.

Human Ep-CAM ELISA Cat. No. RD194024100R, BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

- Conjugate Solution
- Recombinant Human Ep-CAM Standards
- Quality Control High
- Quality Control Low
- Dilution Buffer
- Wash Solution Concentrate 5x
- Substrate Solution
- Stop Solution (0.2 M H₂SO₄)
- Aqua dest.
- Tris Buffer
- 1 Molare Salzsäure
- Natriumchlorid
- BSA
- Saccharose

DNA Mini Kit QIAGEN® QIAamp® DNA Mini Kit 51306

- Puffer AL
- Puffer AW1
- Puffer AW2
- Puffer AE
- Proteinase K
- Ethanol

Material der PCR und Gelelektrophorese

- Taq PCR Mastermix (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Sense Primer rs1126497 5'-ATC CTG ACT GCG ATG AG-3'
- Antisense Primer rs 1126497 5'-AGT GTC CTT GTC TGT TCT TC-3'
- Sense Primer rs1421 5'-AGA CAT CTT TGA AGG TCA TGA GTT-3'
- Antisense Primer rs1421 5'-CCA GTT TCA AGC TGC TTA TAT TTT-3'
- Sense Primer rs5498 5'-AGG GCA CCT ACC TCT GTC GG-3'
- Antisense Primer rs5498 5'-GGC GGT GAG GAT TGC ATT AG-3'
- Restriktionsenzym für rs1126497 BsaAI (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)
- Restriktionsenzym für rs5498 Bst UI (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)
- 10 x TBE-Puffer: TrisBase 108 g, Borsäure 55 g, EDTA 7,44 g (Firma Roth, Deutschland) ad 1l Aqua bidest, Verdünnung 1:20 mit Aqua bidest
- SYBR Safe® DNA Gel Stain (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)
- Agarose (Firma Biozym)

2.1.3 Klinische Daten

Die klinischen Daten, welche für die statistische Auswertung verwendet wurden, wurden retrospektiv den Patientenakten der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Essen entnommen.

In die Betrachtung wurden die kindesbezogenen Parameter Frühgeburtlichkeit und Geburtsgewicht mit einbezogen. Als Cut-Off Wert für die Frühgeburtlichkeit wurde die 37+0 Schwangerschaftswoche definiert, die Daten wurden anhand dieses Wertes nominal skaliert. Entsprechend erfolgte die Nominalskalierung bei dem Geburtsgewicht. Als niedriges Geburtsgewicht wurde ein Gewicht bis 2500 g definiert. Die Definitionen für Frühgeburt und niedriges Geburtsgewicht entsprechen hierbei den aktuellen Definitionen der WHO und deren Kodierung im ICD-10.

Weiterhin wurde entnommen, ob bei den Patientinnen bereits Schwangerschaften und Geburten vorgelegen hatten. Auch hier erfolgte eine Nominalverteilung für Erstschwangere und Erstgebärende.

2.2 Methoden

2.2.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) stellt vom Prinzip her eine Weiterentwicklung des Radioimmunassays (RIA) dar.

Der ELISA wurde zeitgleich von zwei Forschungsgruppen (Schuurs und Bauke aus den Niederlanden sowie Perlmann und Engvall aus Schweden) zu Beginn der siebziger Jahre etabliert. Die Ansätze unterschieden sich im Wesentlichen nur durch die eingesetzten Enzyme. Die Bindung der Enzyme an die relativ kleinen Immunglobuline erfolgt über eine Peptidbindung zwischen einer Aminogruppe und einer Carboxylgruppe (Lequin, R.M. 2005).

Der ELISA funktioniert nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung. Der Reaktionsablauf hängt von der Umgebungstemperatur, dem Enzym und den gebundenen Antikörpern ab. Gegenüber Flüssigkeiten wird die Reaktion an einer Festphase bevorzugt eingesetzt, da es hier zu keiner Kontamination in der Flüssigkeit kommen kann und so bessere Reaktionsbedingungen für das Enzym bestehen.

Der Vorteil des ELISA gegenüber dem RIA liegt vor allem darin, dass keine radioaktiven Materialien verwendet werden. Daher kann zum einen auf besondere Schutzmaßnahmen und Spezialarbeitsplätze verzichtet werden, zum anderen fallen keine radioaktiven Abfälle an. Des Weiteren sind die Tests untereinander besser vergleichbar, da man häufiger mit derselben Reagenz arbeiten kann und das Enzym stabiler ist (Schuurs, A.H.W.M., van Weemen, B.K. 1980).

Mittlerweile wird der ELISA besonders in der Immunologie eingesetzt. Er wurde als Erstes für die Diagnose der Hepatitis B etabliert und ist mittlerweile für eine Vielzahl weiterer Infektionskrankheiten verfügbar. Der Vorteil ist, dass der ELISA einfach durchzuführen, preisgünstig und in großem Maßstab automatisiert einsetzbar ist (Voller et al. 1974).

In dieser Arbeit wurde der Sandwich-ELISA verwendet, bei welchem zwei Antikörper verwendet werden, welche an unterschiedliche Epitope des zu untersuchenden Substrats binden. Alle weiteren Beschreibungen beziehen sich auf diesen.

Die Durchführung erfolgt auf einer polystyrenen Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Wells). Diese Platte wird mit Antikörpern gegen das gesuchte Molekül beschichtet. Die Antikörper haften mittels Adsorption in den Wells (Abb. 3A). Anschließend werden Proben mit dem gesuchten Antigen, Standards und Kontrollen in die Wells pipettiert. Die Platte wird bei Raumtemperatur mindestens eine Stunde auf einem Horizontalschüttler bei ca. 300-500 rpm inkubiert. Die Bindung der Moleküle erfolgt hierbei nach der Antigen-Antikörper-Reaktion (Abb. 3B). Danach erfolgen mehrere Waschschrte, um alle ungebundenen Antigene aus den Wells zu entfernen. Zum Schluss wird die Platte ganz trocken geschlagen (Abb. 3C). Nach dem Waschen und Trocknen wird der Zweitantikörper auf die Platte pipettiert. Dieser bindet an ein anderes Epitop des Antigens und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Zweitantikörper-Komplex. Der Zweitantikörper ist an der F_C-Region mit einem Enzym über eine Peptidbindung verbunden. Meistens handelt es sich dabei um Meerrettichperoxidase, es werden aber auch alkalische Phosphatase oder seltener Glucoseoxidase verwendet. Es folgt eine weitere Inkubation auf dem Schüttler (Abb. 3D). Im Anschluss erfolgt ein weiterer Waschschrte (Abb. 3E). Nun wird das chromogene Substrat auf die Platte pipettiert, welches mit dem Enzym am Zweitantikörper reagiert. Je mehr Antikörper gebunden haben, desto deutlicher wird der Farbumschlag ausfallen. Die Färbung der Platte ist daher proportional zu der Menge des vorhandenen Antigens in der Probe (Abb. 3F). Wichtig ist, dass diese Reaktion im Dunkeln abläuft, da das Substrat sehr lichtreagibel ist und die enzymatisch katalysierte Reaktion durch zu starken Lichteinfall ungleichmäßig abläuft (Abb. 3G). Nach der Inkubation wird eine Stopplösung dazu pipettiert, welche die Enzyme hemmt und die Reaktion zum Stillstand bringt. Hierzu wird meistens Schwefelsäure verwendet. Die Reaktion kommt zum Erliegen und die Farbe verändert sich von blau nach gelb. Wichtig ist, auf gleiche Pipettiergeschwindigkeit und somit auch Reaktionszeit zu achten, damit Abweichungen verringert werden (Abb. 3H). Zum Schluss wird die optische Dichte der Lösung photometrisch gemessen und die Konzentration der Proben wird anhand einer Standardkurve berechnet (Abb. 3I). Bei Auftragung des natürlichen Logarithmus der Konzentration auf der x-Achse und der Extinktion auf der y-Achse ergibt sich eine sigmoide Verlaufsform der Kurve. Um die lineare Regression berechnen zu können, müssen auch auf der y-Achse logarithmische Werte berechnet werden. So erhält man Extinktionswerte von 0 bis 1.

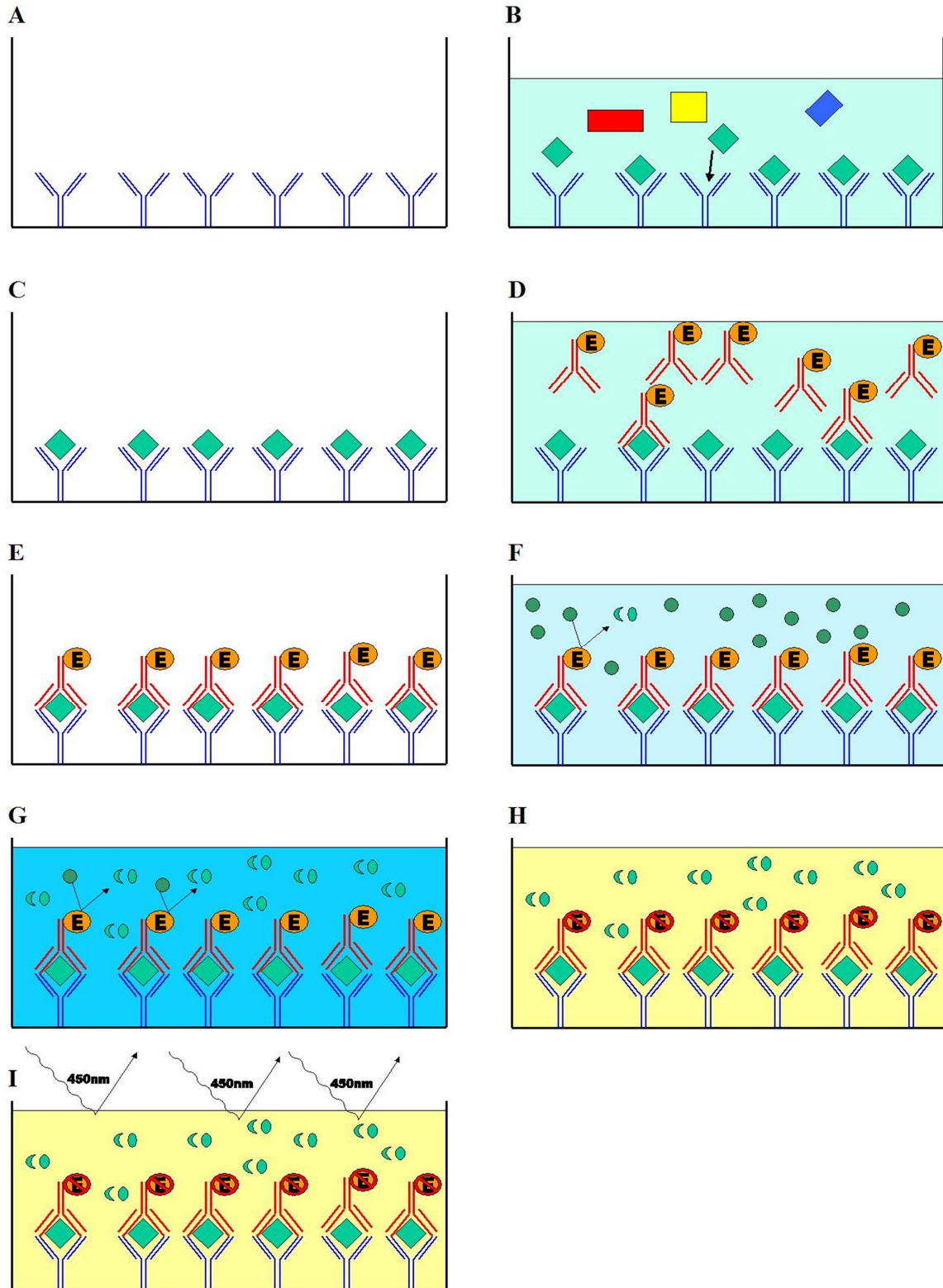


Abbildung 3: Schematische Darstellung des ELISA. 3A Antikörper auf Mikrotiterplatte, 3B Bindung der Antigene, 3C Gebundene Gene nach Waschschrift, 3D Zugabe des Zweitantikörpers, 3E Antikörper-Antigen-Zweitantikörper-Komplex, 3F Zugabe des chromogenen Substrats, 3G Enzymatische Reaktion mit Farbumschlag, 3H Zugabe der Stopplösung, 3I Photometrische Messung.

2.2.2 sICAM-ELISA

Die quantitative Bestimmung des löslichen Intercellular Adhesion Molecule 1 wurde mit dem Quantikine® Human sICAM-1 Immunoassay von R&D Systems durchgeführt (Catalog Number SCD 540). Es handelte sich um einen 2.0 h ELISA, der sich für die Konzentrationsbestimmung von löslichem ICAM-1 aus Zellmaterial, Serum und Plasma eignet. In diesem Fall wurde die Bestimmung mit Serum durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Technik des oben beschriebenen quantitativen Sandwich-ELISAs.

Die Proben und Reagenzien wurden bei Raumtemperatur nach Anleitung vorbereitet. Das Serum wird mit dem Calibrator Diluent im Verhältnis 1:20 verdünnt, zusätzlich wurde eine Standardverdünnungsreihe erstellt. In dieser Versuchsreihe wurden alle Standards, Kontrollen und Proben in Dreifachbestimmung aufgetragen, um eventuelle Abweichungen oder Fehler besser erkennen und eliminieren zu können.

Die genaue Durchführung des ELISA kann man der Anleitung des Quantikine® Human sICAM-1/CD54 Kits entnehmen (Quantikine® 2008).

Die optische Dichte wurde mit einem automatischen Plattenlesegerät bei 450 nm mit einem Korrekturfilter von 620 nm ermittelt. Die Bestimmung erfolgte innerhalb von 30 Minuten, um Verfälschungen durch eventuell weitergelaufene Reaktionen zu vermeiden. Anhand der optischen Dichte der Standards wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die sICAM-Konzentrationen der Proben ermittelt werden konnten.

2.2.3 sEpCAM-ELISA

Für die Bestimmung von sEpCAM im Serum steht kein fertiges Kit zur Verfügung. Es wurden die Reagenzien der Firma BioVendor – Laboratorní medicína a.s. verwendet.

Zum Coaten der Mikrotiterplatten wurde gefriergetrockneter Antikörper zunächst mit Aqua dest. aufgelöst, um eine 100 µg/ml Standardlösung zu erhalten. Als Puffer verwendeten wir eine einmolare Natriumbikarbonatlösung (1 M NaHCO₃), deren pH-Wert bei 8.5 liegen sollte. Bei Abweichen des pH-Wertes wurde der pH-Wert wieder auf 8.5 eingestellt, indem mit 1 M Salzsäure nachtitriert wurde.

Die Coatinglösung setzte sich aus dem Coating Puffer und dem Antikörperkonzentrat im Verhältnis 25:1 zusammen. 100 µl dieser Lösung wurden in die einzelnen Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurde bei jedem Schritt eine neue Pipettenspitze verwendet. Zum Binden der Antikörper auf der Platte wurde diese bei 2-8°C über Nacht inkubiert und dabei mit einem Plate Cover abgedeckt.

Anschließend wurde die Platte einmal gewaschen und der Blockpuffer, bestehend aus TBS, 1% bovine serum albumine und 4% Succrose auf die Platte gegeben.

Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Platte ausgeschlagen und konnte anschließend sofort verwendet oder erneut bei 2-8°C gelagert werden.

Für die Versuchsdurchführung wurden die Seren im Verhältnis 1:3 mit dem Dilution Buffer verdünnt und eine Verdünnungsreihe des Standards erstellt. Die Proben, Kontrollen und Standards wurden auf die vorgecoatete Platte pipettiert und anschließend auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend folgten mehrere Waschschritte, um die ungebundenen EpCAM Moleküle zu entfernen.

Das Konjugat mit dem zweiten monoklonalen Antikörper gegen EpCAM wurde hinzugegeben. Dieser war mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Es folgte eine weitere Inkubation auf dem Schüttler, um die Bindung des Zweitantikörpers an den bereits vorhandenen EpCAM-Antikörper-Komplex zu beschleunigen. Anschließend folgte ein weiterer Waschschritt, um noch vorhandene ungebundene Zweitantikörper zu entfernen. Als Substrat für den Farbumschlag wurde Tetramethylbenzidin hinzugegeben. Diese Reaktion musste im Dunkeln durchgeführt werden, da es sonst zu einer starken Verfälschung der Reaktion kam. Danach wurde die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt, die blaue Farbe veränderte sich zu gelb. Die optische Dichte der Platte wurde spektroskopisch mit einem Mikroplattenleser bestimmt, unter der Verwendung eines Hauptfilters von 450 nm, außerdem wurde ein Referenzfilter von 620 nm als „Nullwert“ verwendet. Die optische Dichte war proportional zur vorhandenen EpCAM-Konzentration in den Proben und Standards. Anhand der bekannten Konzentrationen der Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve ermittelt, anhand welcher die Konzentrationen der einzelnen Proben bestimmt wurden. Als Kontrollen wurden die Kalibrierlösung und Diluents verwendet.

2.2.4 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus dem Patientenserum wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit von QIAGEN durchgeführt. Das Prinzip des Kits ist der Transfer von gewonnener DNA zunächst aus den Zellen in eine Säule, und anschließend Elution ins Zielmedium, in diesem Fall einen Puffer.

Um die DNA zunächst aus den Zellen zu lösen, wurde das zellhaltige Patientenserum mit Proteinkinase A und einem Puffer 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 96-100%igem Ethanol gestoppt. Danach wurde die Mixtur in eine spezielle Spin Column gegeben und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Bei diesem Schritt bleibt die schwerere DNA in dem Filter zurück, das Filtrat kann verworfen werden. Dieser Schritt wurde mit verschiedenen Waschlösungen mehrmals wiederholt, um die DNA aufzureinigen.

In einem letzten Schritt wurde die DNA mit einer Elutionslösung aus der Spin Column ausgewaschen. Falls es notwendig war, die Konzentration der DNA im Medium zu erhöhen (je nach Probe), konnte die Menge der Elutionslösung variiert werden. Die gewonnene DNA konnte bis zu Weiterverarbeitung kühl gelagert oder eingefroren werden. In unseren Experimenten wurde die DNA gekühlt und unmittelbar weiterverarbeitet.

2.2.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beschreibt ein biochemisches Verfahren, um einen gesuchten DNA-Abschnitt (SNP) in vitro beinahe exponentiell zu vervielfältigen. In diesem Fall wurde *Taq* PCR Mastermix von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet.

Die Methode besteht aus mehreren Zyklen mit jeweils drei gleichen Schritten, der Denaturierung oder dem Schmelzen der DNA, dem Annealing, der Anlage der Primer und der Elongation, also der Kettenverlängerung.

Die Denaturierung der DNA erfolgt bei 93-96°C und dauert ca. 30 s. Hierbei lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der komplementären Stränge und die Helix wird entwunden. Das Erbgut liegt danach in Einzelsträngen vor.

Für das Annealing wird die Temperatur schnell auf ca. 56°C gesenkt, die optimale Temperatur ist jedoch bei verschiedenen Matrizen und Primern unterschiedlich.

Während des Annealing lagern sich die gewählten Primer an die komplementären Abschnitte des gewünschten DNA-Segmentes der Einzelstränge an. Dieser Vorgang dauert ca. 30 Sekunden.

Im letzten Schritt erfolgt die Elongation der DNA-Segmente. Dies wird durch die *Taq*-Polymerase katalysiert. Die optimale Temperatur für die *Taq*-Polymerase liegt bei 72°C. Die Länge dieses Schritts hängt von der Länge des gewünschten DNA-Abschnitts sowie dem Anteil von Cytosin und Guanin ab. Die Polymerase lagert pro 30 Sekunden ca. 500 Basenpaare an.

Dieser Vorgang wird ca. 38-40-mal wiederholt, dabei entsteht ein beinahe exponentieller Anstieg des gewünschten Segments.

Für den PCR-Ansatz wurden zunächst 21 µl PCR-Mastermix in ein Eppendorf-Cup pipettiert, anschließend wurde jeweils 1 µl des Sense- und Antisense-Primers hinzugegeben. Die Mischung wurde im Anschluss mit 17 µl Aqua bidest aufgefüllt. Zum Schluss wurden 2 µl DNA hinzugegeben. Der insgesamt 42 µl umfassende PCR-Ansatz wurde anschließend im Thermocycler entsprechend des spezifischen Programms für den jeweiligen Primer weiterverarbeitet.

Für rs1126497 wurde die PCR mit dem sense primer 5'-ATC CTG ACT GCG ATG AG-3' und dem antisense primer 5'-AGT GTC CTT GTC TGT TCT TC-3' durchgeführt, sodass

ein 107 bp langes Fragment entstand. Nach der Denaturierung bei 95°C, erfolgten 38 Zyklen der DNA-Amplifikation mittels Taq PCR Mastermix (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 95°C für 40 s, 56°C für 40 s und 72°C für 40 s.

Die PCR für rs1421 erfolgte mit dem sense primer 5'-AGA CAT CTT TGA AGG TCA TGA GTT-3' und dem antisense primer 5'-CCA GTT TCA AGC TGC TTA TAT TTT-3'. Nach der Denaturierung bei 95°C, erfolgte 38 Zyklen der PCR mit Taq PCR Mastermix mit 95°C für 40 s, 63°C für 40 s und 72°C für 40 s.

Die PCR für rs5498 erfolgte analog dazu mit dem sense primer 5'-AGG GCA CCT ACC TCT GTC GG-3' und dem antisense primer 5'-GGC GGT GAG GAT TGC ATT AG-3'. Es erfolgten 38 PCR Zyklen mit 95°C für 40 s, 60°C für 40 s und 72°C für 40 s.

2.2.6 Analyse der Polymorphismen

Zur Analyse, welcher Polymorphismus bei den einzelnen Patientinnen vorlag, wurden unterschiedliche Verfahren verwendet.

Für den Polymorphismus rs1126497 wurde die Methode des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus angewendet. Bei diesem Verfahren ist es notwendig, dass die zu analysierende DNA-Sequenz bereits bekannt ist. Das den Polymorphismus enthaltende Fragment wurde bereits durch eine PCR amplifiziert. Anschließend wurde ein Enzym, welches abhängig von der DNA Sequenz das Fragment schneidet oder bei vorhandenem Basenaustausch nicht schneidet, durch ein frei verfügbares Suchprogramm (NEBcutter) ausgewählt.

In unserem Fall wurde ein DNA-Fragment von 107 bp Länge amplifiziert. Unter Zugabe des Enzyms BsaAI mit dem entsprechenden Puffer bei einer optimalen Temperatur von 37°C (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) wurde das DNA-Segment in Fragmente von 58 bp und 49 bp für das C-Allell geschnitten, gegenüber einem Fragment von 107 bp für das T-Allell (kein Restriktionsverdau). Zur weiteren Auswertung erfolgte eine Gelelektrophorese mit einem 2,8 % Agarosegel. Für das Gel wurden 3,5 g Agarose mit 125 ml 0,5 x TBE Puffer aufgekocht, anschließend wurde SYBR Safe® DNA Gel Stain (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) hinzugegeben. Aus dem Ansatz wurde ein Gel gegossen und aushärten lassen. Das Gel wurde nach dem Aushärten in 0,5 x TBE Puffer befüllt und eine Spannung von 150 V angelegt. Nach ca. 30-45 Minuten wurden die Abschnitte unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Analog dazu erfolgte die Analyse des Polymorphismus rs5498. Der Restriktionsverdau erfolgte mit dem Enzym Bst UI bei 60° über vier Stunden. Daraus resultiert für das A-Allel ein einzelnes Fragment von 139 bp (kein Verdau) und für das G-Allel resultieren zwei Fragmente von 90 bp und 49 bp.

Im Nachgang erfolgt erneut die bereits oben beschriebene Gelelektrophorese, um die Abschnitte unter UV-Licht sichtbar zu machen.

Zur Analyse des rs1421-Polymorphismus wurde nach der PCR die Methode der Pyrosequenzierung angewendet. Hierbei beobachtet man gewissermaßen den Ablauf der DNA-Polymerase. Bei Anbau des komplementären Nukleotids an den DNA-Strang wird Pyrophosphat (PP_i) freigesetzt. Dieses wird enzymatisch zu ATP umgewandelt, welches wiederum eine Luziferasereaktion antreibt. Das umgesetzte Luziferin gibt ein Lichtsignal ab, welches mit einem Detektor gemessen werden kann und proportional zum verbrauchten ATP ist. Vorteil dieser Methode ist die hohe Automatisierbarkeit und Möglichkeit, viele Proben parallel zu bearbeiten. In diesem Fall wurden die 92 bp langen PCR-Produkte mit dem Primer 5'-CAG GTT TCA CTA TTA CAA AT-3' des PSQ96-Systems des Herstellers Biotage verwendet.

2.2.7 Statistik

Die Datenerhebung erfolgte zunächst mit dem Programm Microsoft Excel 2010, für die weiteren statistischen Berechnungen wurde das Programm SPSS von IBM Version 23.0 verwendet.

Zunächst wurden die Konzentrationen von sICAM und sEpCAM als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Anschließend erfolgte mittels Zweistichproben-Tests (t-Test oder Mann-Whitney U) die Untersuchung, ob zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe Unterschiede bestanden. Zuvor erfolgte zunächst der Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk. Wenn die Werte mindestens in einer Subgruppe von der Normalverteilung abwichen, wurde die gesamte Gruppe als nicht normalverteilt betrachtet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde die statistische Signifikanz mit dem Mann-WhitneyU Test berechnet, bei Daten mit $n > 30$ wurde der T-Test angewendet.

Dieser lässt sich durch den zentralen Grenzwertsatz auch bei nicht normalverteilten Daten ab eine Gruppengröße von $n = 30$ pro Gruppe anwenden (Ghasemi A, Saleh Z 2012).

Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt, das heißt Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn der p-Wert (im Folgenden mit p abgekürzt) kleiner oder gleich 0,05 war.

Die graphische Darstellung erfolgte mittels eines Boxplots. Die Breite der Box zeigt den Bereich, in dem 50% der Daten liegen. Die Begrenzungen werden durch das 25 %-Quartil und 75 %-Quartil gebildet. Eine Linie in der Mitte markiert den Medianwert. Die Whiskers zeigen die Werte, die im 1,5 fachen Interquartilsabstand liegen. Werte, die darüber hinausgehen, werden als Ausreißer definiert. Bis zum dreifachen Interquartilsabstand sind

diese durch einen Kreis dargestellt. Werte, die darüber hinausgehen, werden als extreme Ausreißer bezeichnet und sind durch einen Stern gekennzeichnet.

Die Verteilung der Konzentrationen über die Ausprägung der Polymorphismen wurde deskriptiv mit Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Der Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Konzentration wurde mittels Hypothesentest nach Kruskal-Wallis berechnet. Bei der Auswertung der klinischen Parameter über die Ausprägung der Polymorphismen erfolgte eine Analyse mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson. Im Falle einer Unterschreitung der erwarteten Häufigkeit erfolgte eine rein deskriptive Betrachtung.

Bei der Betrachtung der metrischen Parameter (sICAM und sEpCAM) über die binär verteilten klinischen Parameter Frühgeburtslichkeit und Geburtsgewicht erfolgte eine binär logistische Regression.

Im Falle von Gravität und Parität wurde der Hypothesen-Test nach Mann-WhitneyU verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der Serumkonzentrationen von sICAM und sEpCAM

Zunächst erfolgte eine Auswertung der Serumkonzentrationen von sICAM und sEpCAM verteilt auf das Patientenkollektiv (PE) und die Kontrollgruppe. Vor der Analyse der Zusammenhänge erfolgte eine Berechnung, ob die Parameter in einer Normalverteilung vorliegen. Die Berechnung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test wie unten dargestellt.

Tabelle 1: Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk

Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk				
	Gruppe	Statistik	df	Signifikanz
sICAM-Konzentration (ng/ml)	PE	0,885	48	0,000
	Kontrolle	0,964	30	0,383
sEpCAM-Konzentration (U/ml)	PE	0,825	48	0,000
	Kontrolle	0,891	30	0,005

Somit ergibt sich, dass man bei der Verteilung der Daten nicht von einer Normalverteilung ausgehen kann. Da jedoch in den Untergruppen die Fallzahl bei $n > 30$ liegt, ist wie bereits beschrieben der t-Test nach Anwendung des zentralen Grenzwertsatzes zur Ermittlung der Signifikanz zulässig. Die Verteilung der experimentell ermittelten Werte ist unten tabellarisch (Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2) dargestellt.

Bei der Analyse der sICAM-Konzentrationen (Tabelle 2.1) ergab sich für das Patientenkollektiv ein statistischer Mittelwert von $227 \text{ ng/ml} \pm 65,82$ (Median $215,4 \text{ ng/ml}$) gegenüber einem Mittelwert von $217,7 \text{ ng/ml} \pm 35,56$ (Median $217,7 \text{ ng/ml}$) in der Kontrollgruppe.

Bei der Konzentration von sICAM ergibt sich bei einem p-Wert von 0,421 kein signifikanter Unterschied zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe.

Analog dazu wurde untersucht, ob sich die Konzentrationen von sEpCAM in der Patienten- und in der Kontrollgruppe signifikant voneinander unterscheiden (Tabelle 2.2). Hier zeigt sich im Patientenkollektiv über die gesamte Verteilung eine eindeutig niedrigere Konzentration von sEpCAM im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Patienten ist mit $16,60 \text{ U/ml} \pm 17,37$ (Median $14,4 \text{ U/ml}$) nur halb so groß wie der Mittelwert der Kontrollgruppe mit $32,66 \text{ U/ml} \pm 26,37$ (Median $26,58 \text{ U/ml}$). Somit zeigt sich eine

signifikant niedrigere Konzentration von sEpCAM im Patientenkollektiv gegenüber der Kontrollgruppe bei einem p-Wert von 0,003.

Tabelle 2.1: Vergleich der Konzentration von sICAM im Serum in der Patienten- und Kontrollgruppe

Vergleich der Konzentration von sICAM im Serum [in ng/ml]		
	Patienten	Kontrollen
Anzahl n	48	30
Minimum	128,66	137,78
25. Perzentil	181,90	195,80
Median	215,44	217,72
75. Perzentil	252,80	244,60
Maximum	441,22	282,36
Mittelwert	227,02	217,71
Standardabweichung	65,82	35,56
Standardfehler	9,50	6,49
p-Wert (t-Test)		0,421

Tabelle 2.2: Vergleich der Konzentration von sEpCAM im Serum in der Patienten- und Kontrollgruppe

Vergleich der Konzentration von sEpCAM im Serum [in U/ml]		
	Patienten	Kontrollen
Anzahl n	48	35
Minimum	0,00	0,00
25. Perzentil	0,00	16,67
Median	14,41	26,58
75. Perzentil	30,73	40,58
Maximum	48,93	111,26
Mittelwert	16,60	32,66
Standardabweichung	17,37	26,37
Standardfehler	2,51	4,46
p-Wert (t-Test)		0,003

Zur besseren Anschaulichkeit ist die Verteilung beider Gruppen unten graphisch in Form eines Box-Plots dargestellt.

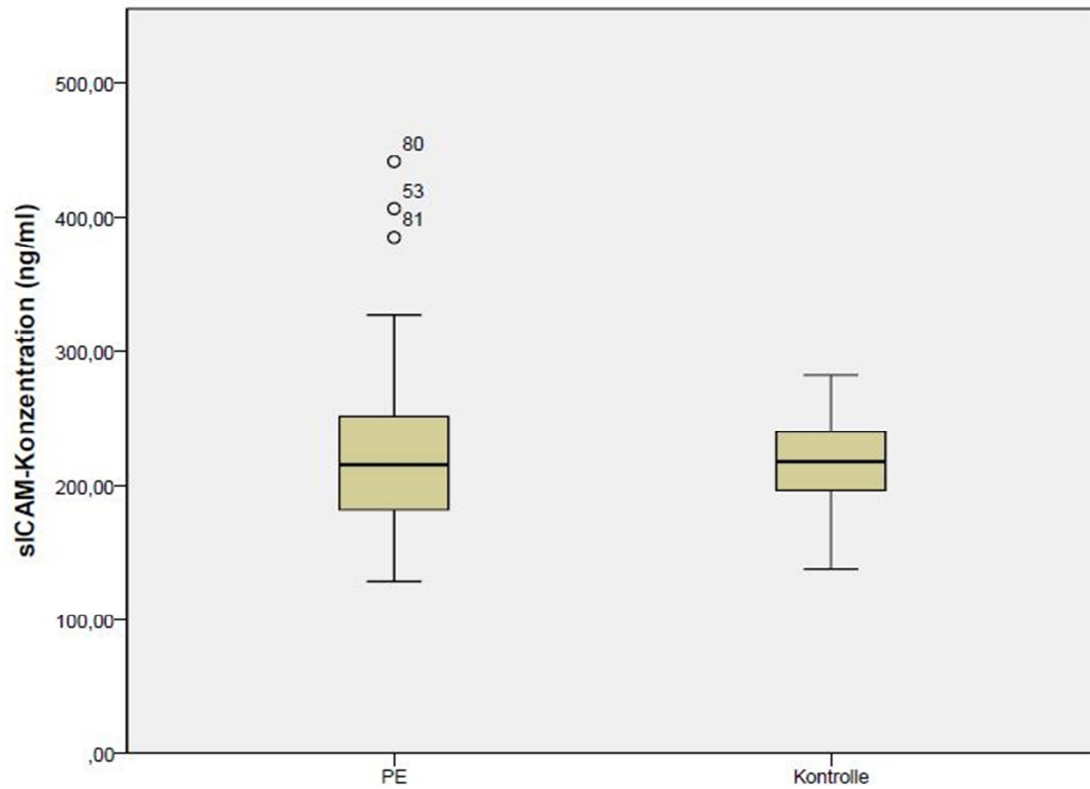


Abbildung 4: Boxplot zur Verteilung der sICAM-Konzentration bei Patientinnen (PE) und Kontrollen

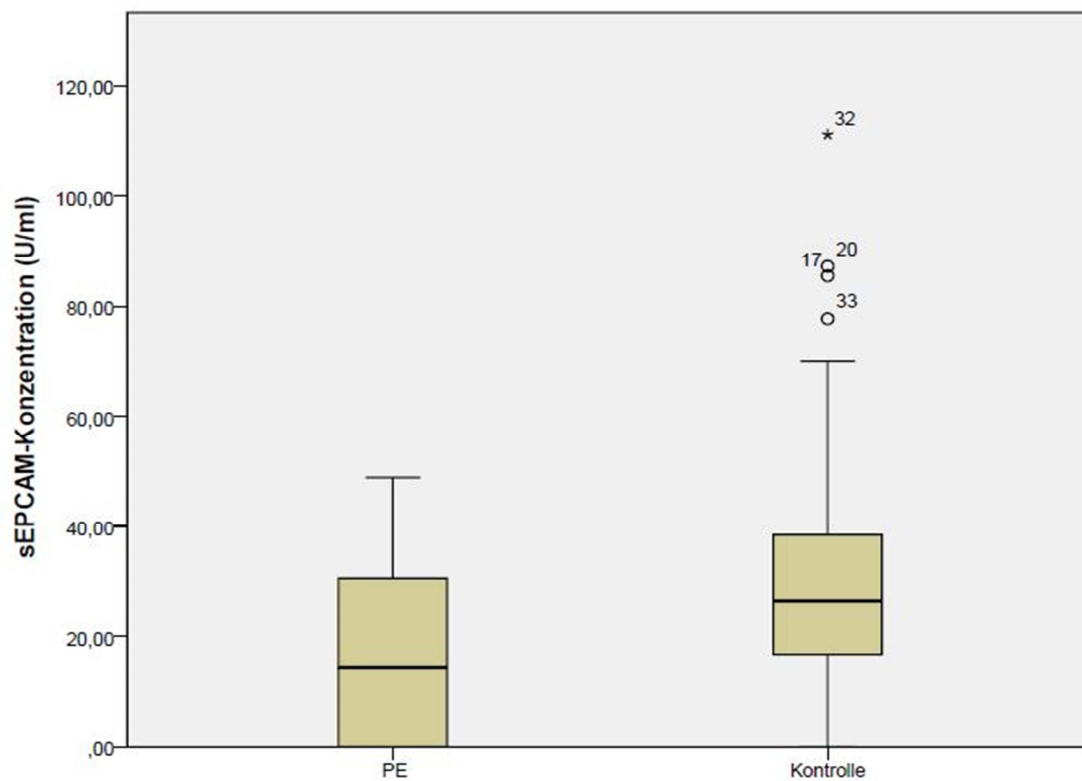


Abbildung 5: Boxplot zur Verteilung der sEpCAM-Konzentration bei Patientinnen (PE) und Kontrollen

3.2 Analyse der Polymorphismen

Bei der Analyse der SNPs wurden, wie bereits in Kapitel 1.3.1 erläutert, ein Polymorphismus des ICAM-1 Gens gewählt (rs5498) und zwei Polymorphismen des EpCAM-Gens TACSTD1 (rs1421 und rs1126497).

Bei der folgenden Analyse wurden die Konzentrationen von sICAM und sEpCAM mit den jeweiligen Genotypen des zu untersuchenden Polymorphismus korreliert.

3.2.1 ICAM-1-Polymorphismus rs5498

Der ICAM-1-Polymorphismus rs5498 liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 19 im Abschnitt 19p13.2. Die Gensequenz lautet:

5'-GGAGCACTCAAGGGGAGGTCACCCGC[A/G]AGGTGACCGTGAATGTGCTCTGTGA-3'

Die Genotypen des Polymorphismus sind AA, AG und GG. Die G-Allelfrequenz wird in der Literatur mit 0,3494 angegeben. Die G-Allelfrequenz für das betrachtete Kollektiv kommt diesem Wert nahe mit einer Frequenz von 0,367 und liegt im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Im Protein kommt es dadurch zu einer funktionellen Mutation am C-Terminus, hier wird Glutamin gegen Lysin ersetzt (Bielinski et al. 2011).

Mittels des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson wurde analysiert, ob zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe eine unterschiedliche Verteilung der Genotypen besteht. Dargestellt wurden sowohl die ermittelten, als auch die erwarteten Häufigkeiten. Da die erwartete Häufigkeit in allen Zellen größer 5 ist, ist die Berechnung nach Pearson zulässig.

Tabelle 3: Kreuztabelle zur Verteilung der Patientinnen und Kontrollen über rs5498

			ICAM-1 / rs5498			Gesamt
			AA	AG	GG	
Gruppennummer	PE	Anzahl	22	18	8	48
		Erwartete Anzahl	21,7	17,6	8,8	48,0
		% der Gesamtzahl	26,8%	22,0%	9,8%	58,5%
	Kontrolle	Anzahl	15	12	7	34
		Erwartete Anzahl	15,3	12,4	6,2	34,0
		% der Gesamtzahl	18,3%	14,6%	8,5%	41,5%
Gesamt		Anzahl	37	30	15	82
		Erwartete Anzahl	37,0	30,0	15,0	82,0
		% der Gesamtzahl	45,1%	36,6%	18,3%	100,0%
Chi-Quadrat nach Pearson: Asymptotische Signifikanz						p = 0,902

Es zeigt sich, dass sich bei einem p-Wert von 0,902 kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Gruppen ergibt.

Bei der Betrachtung der sICAM-Konzentration verteilt über die einzelnen Gruppen von rs5498 zeigt sich, dass zwischen den einzelnen Gruppen kein wesentlicher Unterschied besteht.

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde bei mehr als drei Gruppen und nicht normalverteilten Variablen der Hypothesentest nach Kruskal-Wallis angewendet. Es zeigt sich, dass sich bei der Verteilung der Konzentration von sICAM im Patientenkollektiv kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Polymorphismen ermitteln lässt ($p = 0,563$). Das gilt ebenfalls für die Kontrollgruppe ($p = 0,115$).

Tabelle 4: Verteilung der sICAM-Konzentration in ng/ml über rs5498 im Patientenkollektiv

Verteilung der sICAM-Konzentration in ng/ml über rs5498 im Patientenkollektiv				
	AA	AG	GG	Gesamt
Mittelwert	215,38	236,32	238,18	227,02
N	22	18	8	48
STD	55,18	70,88	81,41	65,82
Minimum	129,26	162,06	128,66	128,66
Maximum	385,1	441,22	406,42	441,22
Hypothesentest nach Kruskal-Wallis				$p = 0,563$

Tabelle 5: Verteilung der sICAM-Konzentration in ng/ml über rs5498 in der Kontrollgruppe

Verteilung der sICAM-Konzentration in ng/ml über rs5498 in der Kontrollgruppe				
	AA	AG	GG	Gesamt
Mittelwert	217,34	227,69	198,63	216,03
N	13	9	7	29
STD	34,21	43,28	17,47	34,96
Minimum	147,8	137,78	167,64	137,78
Maximum	268,02	282,36	224,24	282,36
Hypothesentest nach Kruskal-Wallis				$p = 0,115$

Zusammenfassend ergibt sich also, dass unterschiedliche Genotypen des ICAM-1-Polymorphismus rs5498 keine Assoziation mit der Serumkonzentration von sICAM bei der Schwangerschaft zeigt.

3.2.2 EpCAM-Polymorphismus rs1126497

Der EpCAM-Polymorphismus rs1126497 liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 im Abschnitt 2p21. Die Gensequenz lautet:

5'-GGCCAAGCAGTGCAACGGCACCTCCA[C/T]GTGCTGGTGTGTGAACACTGCTGGG-3'

Die zu betrachtenden Genotypen sind CC, CT und TT. Die in der Literatur angegebene Allelfrequenz beträgt $T = 0,3407$. Die im Studienkollektiv errechnete Allelfrequenz ergab einen Wert von $T = 0,4759$. Es zeigt sich also ein höheres Auftreten des T-Allels, die Verteilung befindet sich allerdings rechnerisch im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Der Polymorphismus bewirkt einen Aminosäureaustausch an Stelle 115 im Protein. Hier wird Threonin gegen Methionin ersetzt.

In Analogie zu rs5498 erfolgte zunächst die Betrachtung der Verteilung der Gruppen PE und Kontrolle über die Ausprägungen von rs1126497 in einer Kreuztabelle. Die Signifikanz wurde mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson berechnet. Es wurde untersucht, ob die Merkmale signifikant miteinander in Zusammenhang stehen.

Tabelle 6: Kreuztabelle zur Verteilung der Patientinnen und Kontrollen über rs1126497

			EpCAM / rs1126497			Gesamt
			CC	CT	TT	
Gruppennummer PE	Anzahl		13	25	8	46
	Erwartete Anzahl		13,8	19,0	13,2	46,0
	% der Gesamtzahl		16,3%	31,3%	10,0%	57,5%
Kontrolle	Anzahl		11	8	15	34
	Erwartete Anzahl		10,2	14,0	9,8	34,0
	% der Gesamtzahl		13,8%	10,0%	18,8%	42,5%
Gesamt	Anzahl		24	33	23	80
	Erwartete Anzahl		24,0	33,0	23,0	80,0
	% der Gesamtzahl		30,0%	41,3%	28,7%	100,0%
Chi-Quadrat nach Pearson: Asymptotische Signifikanz						$p = 0,009$

Es zeigte sich, dass im Patientenkollektiv mehr Patientinnen den Polymorphismus CT aufweisen ($n = 25$) als in der Kontrollgruppe ($n = 8$). Im Gegensatz dazu haben weniger Patientinnen die Ausprägung TT ($n = 8$) als gesunde Kontrollen ($n = 15$). Dieser Aspekt ist bei einem $p = 0,009$ signifikant. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Gruppengröße mit 80 Patienten relativ klein ist.

Die Konzentration von sEpCAM über die Genotypen von rs1126497 ist unten tabellarisch dargestellt. Die Verteilung der Konzentrationen von sEpCAM innerhalb der Gruppen stellt sich verhältnismäßig homogen dar. Zur Analyse, ob ein Unterschied der Konzentrationen in Abhängigkeit der Polymorphismen vorliegt, wurde erneut der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

Tabelle 7: Verteilung der sEpCAM-Konzentration in U/ml über rs1126497 im Patientenkollektiv

Verteilung der sEpCAM-Konzentration in U/ml über rs1126497 im Patientenkollektiv				
	AA	AG	GG	Gesamt
Mittelwert	14,46	19,27	15,88	17,32
N	13	25	8	46
STD	17,95	17,61	17,29	17,39
Minimum	0	0	0	0
Maximum	44	49	48	49
Hypothesentest nach Kruskal-Wallis				p = 0,791

Tabelle 8: Verteilung der sEpCAM-Konzentration in U/ml über rs1126497 in der Kontrollgruppe

Verteilung der sEpCAM-Konzentration in U/ml über rs1126497 in der Kontrollgruppe				
	AA	AG	GG	Gesamt
Mittelwert	36,96	35,32	32,44	34,64
N	11	8	14	33
STD	20,07	26,89	30,57	25,84
Minimum	16,77	3,55	8,41	3,55
Maximum	87,29	77,8	111,25	111,25
Hypothesentest nach Kruskal-Wallis				p = 0,302

Bei Betrachtung der Verteilung der Konzentration von sEpCAM zeigt sich zwischen Patientengruppe (p = 0,791) und Kontrollgruppe (p = 0,302) kein statistisch signifikanter Unterschied.

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass die unterschiedlichen Genotypen von rs1126497 keinen Einfluss auf die Konzentration von sEpCAM im Serum zu haben scheinen. Dies ist unabhängig davon, ob eine Präeklampsie vorliegt oder nicht.

3.2.3 EpCAM-Polymorphismus rs1421

Der zweite EpCAM-Polymorphismus rs1421 befindet sich ebenfalls auf dem Chromosom 2 im Abschnitt 2p21. Die Gensequenz des amplifizierten Fragmentes ist:

5'-TGAGTACAGGTTTCACTATTACAAAT[A/G]TATGATGTTAACTAACAACTCAT-3'

Das heißt, die drei verschiedenen Genotypen zeigen die Ausprägung AA, AG und GG. Die Allelfrequenz in der Literatur ist mit $G = 0,1218$ angegeben, ähnlich hierzu ließ sich im Studienkollektiv eine Allelfrequenz von $G = 0,18$ ermitteln. Der Polymorphismus bewirkt eine Veränderung in der has-miR 1183-Bindungsstelle und verursacht die Entstehung einer neuen Kombination von micro-RNA (has-miRNA-370 und has-miRNA-517a).

Zunächst erfolgt wieder die Betrachtung der Verteilung innerhalb der beiden Gruppen.

Tabelle 9: Kreuztabelle zur Verteilung der Patientinnen und Kontrollen über rs1421

			EpCAM / rs1421			Gesamt
			AA	AG	GG	
Gruppennummer	PE	Anzahl	33	11	4	48
		Erwartete Anzahl	35,7	9,4	2,9	48,0
		% der Gesamtzahl	40,2%	13,4%	4,9%	58,5%
	Kontrolle	Anzahl	28	5	1	34
		Erwartete Anzahl	25,3	6,6	2,1	34,0
		% der Gesamtzahl	34,1%	6,1%	1,2%	41,5%
Gesamt		Anzahl	61	16	5	82
		Erwartete Anzahl	61,0	16,0	5,0	82,0
		% der Gesamtzahl	74,4%	19,5%	6,1%	100,0%

Da zwei Zellen eine erwartete Häufigkeit kleiner 5 haben, ist die Berechnung der Signifikanz mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson nicht zulässig. Es ist somit lediglich eine deskriptive Darstellung des Ergebnisses möglich. Auffallend ist, dass sowohl in der Patienten-, als auch in der Kontrollgruppe die Mehrheit der Testpersonen die Ausprägung „AA“ aufweist, die Ausprägung „GG“ ist in beiden Gruppen eher gering. Allein bei dieser Betrachtung kann man davon ausgehen, dass die Zugehörigkeit zu einer der drei Subgruppen vermutlich keinen Einfluss auf das Risiko für eine Präeklampsie hat.

Als Nächstes folgt die Verteilung der Konzentration von sEpCAM über rs1421.

Tabelle 10: Verteilung der sEpCAM-Konzentration in U/ml über rs1421 im Patientenkollektiv

Verteilung der sEpCAM-Konzentration in U/ml über rs1421 im Patientenkollektiv				
	AA	AG	GG	Gesamt
Mittelwert	14,02	26,53	10,50	16,60
N	33	11	4	48
STD	15,56	19,14	21,01	17,38
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00
Maximum	49,00	48,00	42,00	49,00
Hypothesentest nach Kruskal-Wallis				p = 0,065

Tabelle 11: Verteilung der sEpCAM-Konzentration in U/ml über rs1421 in der Kontrollgruppe

Verteilung der sEpCAM-Konzentration in U/ml über rs1421 in der Kontrollgruppe				
	AA	AG	GG	Gesamt
Mittelwert	34,72	35,93	25,98	34,64
N	27	5	1	33
STD	27,59	19,4	-	25,84
Minimum	3,55	22,36	25,98	3,55
Maximum	111,25	69,99	25,98	111,25
Hypothesentest nach Kruskal-Wallis				p = 0,830

Die Darstellung zeigt die Verteilung der Serumkonzentrationen von sEpCAM über die Subgruppen von rs1421. Zur Berechnung der Signifikanz wurde erneut bei unabhängigen Stichproben mit mehr als zwei Subgruppen der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

Es zeigt sich, dass die Verteilung der Konzentration von sEpCAM über die Subgruppen von rs1421 sowohl innerhalb der Patientengruppe (p = 0,065) als auch in der Kontrollgruppe (p = 0,830) keinen signifikanten Unterschied aufweist.

In Zusammenschau lässt sich sagen, dass die unterschiedlichen Genotypen von rs1421 keinen Einfluss auf die Serumkonzentration von sEpCAM zu haben scheinen, weder bei Präeklampsie-Patientinnen noch in der Kontrollgruppe.

3.3 Auswertung der klinischen Parameter

3.3.1 Einfluss der Polymorphismen auf Frühgeburtlichkeit und Geburtsgewicht

Bei der Auswertung der klinischen Parameter wurden das Geburtsgewicht, die Frühgeburtlichkeit sowie die Gravidität und Parität betrachtet. Die Daten wurden retrospektiv aus den Patientenakten erhoben.

Zunächst erfolgt die Betrachtung, ob die Zugehörigkeit zu einer der Subgruppen der Polymorphismen einen Einfluss auf die Frühgeburtlichkeit oder ein niedriges Geburtsgewicht hat.

Bei den Polymorphismen ICAM-1/rs5498 und EpCAM/rs1421 erfolgt lediglich die Darstellung des Gesamtkollektivs, da im Vorfeld bereits gezeigt wurde, dass zwischen Patienten- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied zwischen den Polymorphismen besteht. Grundsätzlich ist im Gesamtkollektiv auf Grund der ausreichenden Fallzahl eine Berechnung der Signifikanz mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson möglich.

Tabelle 12: Kreuztabelle rs5498 in Bezug auf die Frühgeburt

			Frühgeburt		Gesamt
			nein	ja	
rs5498	AA	Anzahl	14	17	31
		Erwartete Anzahl	14,1	16,9	31
		% der Gesamtzahl	21,2%	25,8%	47,0%
	AG	Anzahl	10	14	24
		Erwartete Anzahl	10,9	13,1	24
		% der Gesamtzahl	15,2%	21,2%	36,4%
	GG	Anzahl	6	5	11
		Erwartete Anzahl	5,0	6,0	11,0
		% der Gesamtzahl	9,1%	7,6%	16,7%
Gesamt		Anzahl	30	36	66
		Erwartete Anzahl	30,0	36,0	66,0
		% der Gesamtzahl	45,5%	54,5%	100,0%
Chi-Quadrat nach Pearson: Asymptotische Signifikanz:					p = 0,776

Tabelle 13: Kreuztabelle rs5498 in Bezug auf das Geburtsgewicht

			Geburtsgewicht < 2500 g		Gesamt
			nein	ja	
rs5498	AA	Anzahl	15	16	31
		Erwartete Anzahl	13,6	17,4	31
		% der Gesamtzahl	22,7%	24,2%	47,0%
	AG	Anzahl	10	14	24
		Erwartete Anzahl	10,5	13,5	24
		% der Gesamtzahl	15,2%	21,2%	36,4%
	GG	Anzahl	4	7	11
		Erwartete Anzahl	4,8	6,2	11,0
		% der Gesamtzahl	6,1%	10,6%	16,7%
Gesamt		Anzahl	29	37	66
		Erwartete Anzahl	29,0	37,0	66,0
		% der Gesamtzahl	43,9%	56,1%	100,0%
Chi-Quadrat nach Pearson: Asymptotische Signifikanz:					p = 0,757

Die Tabellen 12 und 13 stellen die Verteilung von Frühgeburtlichkeit und Geburtsgewicht bei dem ICAM-1-Polymorphismus rs5498 dar. Bei Betrachtung der Frühgeburtlichkeit über die Subgruppen von rs5498 ließ sich ein p-Wert von 0,776 berechnen, bei der Betrachtung des Geburtsgewichts über die einzelnen Subgruppen ein p-Wert von 0,757. Daraus ergibt sich, dass zwischen dem Polymorphismus rs5498 und der Frühgeburtlichkeit und dem Geburtsgewicht keine signifikante Assoziation besteht.

Bei Betrachtung derselben Parameter in Abhängigkeit des EpCAM-Polymorphismus rs1421 stellt sich ein ähnliches Ergebnis dar.

Da in mehreren Zellen die erwartete Häufigkeit kleiner 5 ist, ist eine Berechnung der Signifikanz mittels des Chi-Quadrat-Tests nicht möglich, sondern lediglich eine rein deskriptive Beschreibung (Tabelle 14 und Tabelle 15).

Tabelle 14: Kreuztabelle rs1421 in Bezug auf die Frühgeburt

			Frühgeburt		Gesamt
			nein	ja	
rs1421	AA	Anzahl	26	25	51
		Erwartete Anzahl	23,2	27,8	51
		% der Gesamtzahl	39,4%	37,9%	77,3%
	AG	Anzahl	3	8	11
		Erwartete Anzahl	5,0	6,0	11,0
		% der Gesamtzahl	4,5%	12,1%	16,7%
	GG	Anzahl	1	3	4
		Erwartete Anzahl	1,8	2,2	4,0
		% der Gesamtzahl	1,5%	4,5%	6,1%
Gesamt		Anzahl	30	36	66
		Erwartete Anzahl	30,0	36,0	66,0
		% der Gesamtzahl	45,5%	54,5%	100,0%

Tabelle 15: Kreuztabelle rs1421 in Bezug auf das Geburtsgewicht

			Geburtsgewicht < 2500 g		Gesamt
			nein	ja	
rs1421	AA	Anzahl	24	27	51
		Erwartete Anzahl	22,4	28,6	51
		% der Gesamtzahl	36,4%	40,9%	77,3%
	AG	Anzahl	3	8	11
		Erwartete Anzahl	4,8	6,2	11
		% der Gesamtzahl	4,5%	12,1%	16,7%
	GG	Anzahl	2	2	4
		Erwartete Anzahl	1,8	2,2	4,0
		% der Gesamtzahl	3,0%	3,0%	6,1%
Gesamt		Anzahl	29	37	66
		Erwartete Anzahl	29,0	37,0	66,0
		% der Gesamtzahl	43,9%	56,1%	100,0%

Bei Betrachtung der Gruppen fällt lediglich auf, dass bei der Merkmalsausprägung „AG“ sowohl mehr Frühgeburten, als auch häufiger ein niedriges Geburtsgewicht aufgetreten sind. Der Unterschied reicht bei der kleinen Fallzahl jedoch nicht aus, um hieraus einen Zusammenhang abzuleiten. In den anderen Subgruppen ist die Verteilung tendenziell gleich. Somit besteht am ehesten kein Einfluss auf die Parameter Frühgeburtslichkeit und niedriges Geburtsgewicht durch den Polymorphismus rs1421.

Bei dem EpCAM-Polymorphismus rs1126497 liegt, wie oben bereits dargestellt, eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Genotypen zwischen der Gruppenzugehörigkeit von Patientinnen und Kontrollen vor. Daher ist es hier sinnvoll, nicht nur das Gesamtkollektiv, sondern auch Patientinnen und Kontrollen getrennt zu betrachten.

Tabelle 16: Kreuztabelle rs1126497 in Bezug auf die Frühgeburt, Gesamtkollektiv

			Frühgeburt		Gesamt
			nein	ja	
rs1126497	CC	Anzahl	9	11	20
		Erwartete Anzahl	9,1	10,9	20
		% der Gesamtzahl	14,1%	17,2%	31,3%
	CT	Anzahl	11	15	26
		Erwartete Anzahl	11,8	14,2	26
		% der Gesamtzahl	17,2%	23,4%	40,6%
	TT	Anzahl	9	9	18
		Erwartete Anzahl	8,2	9,8	18,0
		% der Gesamtzahl	14,1%	14,1%	28,1%
Gesamt		Anzahl	29	35	64
		Erwartete Anzahl	29,0	35,0	64,0
		% der Gesamtzahl	45,3%	54,7%	100,0%
Chi-Quadrat nach Pearson: Asymptotische Signifikanz:					p = 0,880

Bei Betrachtung der Frühgeburtslichkeit in Bezug auf rs1126497 im Gesamtkollektiv (Tabelle 16) lässt sich nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson ein p-Wert von 0,880 berechnen. Es besteht somit keine statistisch signifikante Assoziation.

Tabelle 17: Kreuztabelle rs1126497 in Bezug auf das Geburtsgewicht, Gesamtkollektiv

			Geburtsgewicht < 2500 g		Gesamt
			nein	ja	
rs1126497	CC	Anzahl	8	12	20
		Erwartete Anzahl	8,8	11,3	20
		% der Gesamtzahl	12,5%	28,8%	31,3%
	CT	Anzahl	9	17	26
		Erwartete Anzahl	11,4	14,6	26
		% der Gesamtzahl	14,1%	26,6%	40,6%
	TT	Anzahl	11	7	18
		Erwartete Anzahl	7,9	10,1	18,0
		% der Gesamtzahl	17,2%	10,9%	28,1%
Gesamt		Anzahl	26	36	64
		Erwartete Anzahl	28,0	36,0	64,0
		% der Gesamtzahl	43,8%	56,3%	100,0%
Chi-Quadrat nach Pearson: Asymptotische Signifikanz: p = 0,472					

Bei dem Parameter Geburtsgewicht erfolgte eine Unterteilung in zwei Gruppen, wobei ein niedriges Geburtsgewicht < 2500 g definiert war und ein normales Geburtsgewicht > 2500 g.

Bei der statistischen Betrachtung des Geburtsgewichts zeigt sich mittels Chi-Quadrat-Test kein signifikantes Ergebnis (p = 0,472).

Bei getrennter Betrachtung des Patientenkollektivs und der Kontrollgruppe ist eine Berechnung der Signifikanz mittels Chi-Quadrat-Test nicht möglich, da die erwarteten Häufigkeiten in mehreren Zellen kleiner als 5 sind. Betrachtet man jedoch die Tabelle 18, fällt auf, dass sich die klinischen Parameter innerhalb der Subgruppen nicht wesentlich unterscheiden.

Tabelle 18: Kreuztabelle rs1126497 in Bezug auf die Frühgeburt, Gruppen getrennt

			Patientenkollektiv			Kontrollgruppe		
			Frühgeburt		Gesamt	Frühgeburt		Gesamt
			nein	ja		Nein	ja	
rs1126497	CC	Anzahl	5	8	13	4	3	7
		% der Gesamtzahl	11,4%	18,2%	29,5%	20,0%	15,0%	35,0%
	CT	Anzahl	8	15	23	3	0	3
		% der Gesamtzahl	18,2%	34,1%	52,3%	15,0%	0,0%	15,0%
	TT	Anzahl	2	6	8	7	3	10
		% der Gesamtzahl	4,5%	13,6%	18,2%	35,0%	15,0%	50,0%
Gesamt		Anzahl	15	29	44	14	6	20
		% der Gesamtzahl	34,1%	65,9%	100,0%	70,0%	30,0%	100,0%

Tabelle 19: Kreuztabelle rs1126497 in Bezug auf das Geburtsgewicht, Gruppen getrennt

			Patientenkollektiv			Kontrollgruppe		
			Geburtsgewicht < 2500 g		Gesamt	Geburtsgewicht < 2500 g		Gesamt
			Nein	ja		nein	ja	
rs1126497	CC	Anzahl	3	10	13	5	2	7
		% der Gesamtzahl	6,8%	22,7%	29,5%	25,0%	10,0%	35,0%
	CT	Anzahl	7	16	23	2	1	3
		% der Gesamtzahl	15,9%	36,4%	52,3%	10,0%	5,0%	15,0%
	TT	Anzahl	4	4	8	7	3	10
		% der Gesamtzahl	9,1%	9,1%	18,2%	35,0%	15,0%	50,0%
Gesamt		Anzahl	14	30	44	14	6	20
		% der Gesamtzahl	31,8%	68,2%	100,0%	70,0%	30,0%	100,0%

3.3.2 Einfluss von sICAM und sEpCAM auf die Frühgeburtlichkeit und das Geburtsgewicht

Die Serumkonzentration von sEpCAM im Patientenkollektiv ist signifikant niedriger als die in der Kontrollgruppe. Demzufolge ist es sinnvoll zu überprüfen, ob auch ein Einfluss der Serumkonzentration auf die klinischen Parameter Frühgeburtlichkeit und Geburtsgewicht besteht. Zunächst erfolgt die Betrachtung, ob zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe ein Unterschied dieser beiden Parameter zu finden ist. Die Analyse erfolgt mittels Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test nach Pearson.

Wie in der Tabelle 20 dargestellt, ist der Anteil an Frühgeburten in der Patientengruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe. In der Patientengruppe waren 65,2 % Frühgeburten, in der Kontrollgruppe waren es hingegen nur 33,3 %. Das Ergebnis ist mit einem p-Wert von 0,015 statistisch signifikant. Dies zeigt, dass das Studienkollektiv klinisch für die Präeklampsie repräsentativ ist, da die Präeklampsie mit einer erhöhten Rate von Frühgeburten einhergeht.

Tabelle 20: Kreuztabelle Frühgeburt verteilt auf die Gruppen

			Gruppe		Gesamt
			PE	Kontrolle	
Frühgeburt	nein	Anzahl (Prozent)	16 (34,8)	14 (66,7)	30 (44,8)
		Erwartete Anzahl	20,6	9,4	30,0
	ja	Anzahl (Prozent)	30 (65,2)	7 (33,3)	37 (55,2)
		Erwartete Anzahl	25,4	11,6	37,0
Gesamt		Anzahl	46	21	67
		Erwartete Anzahl	46,0	21,0	67,0
Chi-Quadrat-Test nach Pearson				p = 0,015	

Analog dazu stellt sich die Kreuztabelle der Verteilung des Geburtsgewichtes verteilt auf die beiden Gruppen dar (Tabelle 21). Das Ergebnis ist mit einem p-Wert von 0,009 ebenfalls statistisch signifikant, was sich durch die deutlich erhöhte Rate an Frühgeburten in der Patientengruppe nachvollziehen lässt.

Tabelle 21: Kreuztabelle Geburtsgewicht verteilt auf die Gruppen

			Gruppe		Gesamt
			PE	Kontrolle	
Geburtsgewicht < 2500 g	nein	Anzahl (Prozent)	15 (32,6)	14 (66,7)	29 (43,3)
		Erwartete Anzahl	19,9	9,1	29
	ja	Anzahl (Prozent)	31 (67,4)	7 (30,3)	38 (56,7)
		Erwartete Anzahl	26,1	11,9	38
Gesamt		Anzahl	46	21	67
		Erwartete Anzahl	46	21	67
Chi-Quadrat-Test nach Pearson				p = 0,009	

Zur Analyse, ob die Serumkonzentration von sICAM und sEpCAM einen Einfluss auf die Frühgeburtlichkeit hat, erfolgt eine bivariate logistische Analyse, da es sich bei der Frühgeburt um eine binär verteilte Variable handelt. Dasselbe Verfahren wurde genutzt, um den Einfluss der Serumkonzentrationen auf das Geburtsgewicht zu untersuchen.

In den Tabellen 22 und 23 sind jeweils die Endergebnisse der bivariaten logistischen Analyse in Form des p-Wertes dargestellt. Dabei erfolgte sowohl eine Unterteilung in das Patientenkollektiv und in die Kontrollgruppe als auch eine Darstellung der Gesamtpopulation, um zu testen, ob die Serumkonzentration von sICAM und sEpCAM unabhängig der Präeklampsie einen Einfluss auf die Frühgeburtlichkeit oder das Geburtsgewicht hat oder ob dies nur bei erkrankten Patientinnen der Fall ist.

In der Tabelle 22 zeigt sich, dass keine Assoziation zwischen dem Geburtsgewicht und der Serumkonzentration von sICAM oder sEpCAM besteht. Dargestellt wurden hier nur die p-Werte. In der Patientengruppe stellt sich sowohl bei Betrachtung von sICAM ($p = 0,492$) und bei sEpCAM ($p = 0,218$) kein signifikantes Ergebnis dar. Dies gilt im selben Maße für die Kontrollgruppe.

Tabelle 22: Bivariate logistische Analyse der Serumkonzentrationen von sICAM und sEpCAM über das Geburtsgewicht

Einfluss der Konzentrationen auf das Geburtsgewicht		
	sICAM-Konzentration	sEpCAM-Konzentration
PE	0,492	0,218
Kontrollgruppe	0,637	0,774
Gesamtkollektiv	0,507	0,130

Tabelle 23: Bivariate logistische Analyse der Serumkonzentrationen von sICAM und sEpCAM über die Frühgeburtlichkeit

Einfluss der Konzentrationen auf die Frühgeburtlichkeit		
	sICAM-Konzentration	sEpCAM-Konzentration
PE	0,405	0,133
Kontrollgruppe	0,699	0,595
Gesamtkollektiv	0,292	0,037

Bei der Analyse der Frühgeburtlichkeit in Tabelle 23 fällt auf, dass bei Betrachtung der Patientengruppe kein signifikanter Unterschied in der Serumkonzentration von sICAM ($p = 0,405$) und sEpCAM ($p = 0,133$) zu finden ist. Auch in der Kontrollgruppe alleine ist hier kein signifikantes Ergebnis zu sehen. Die Berechnung erfolgt innerhalb einer Subgruppenanalyse, sodass die kleinere Fallzahl entsprechend berücksichtigt werden muss. Im Vorfeld wurde bereits gezeigt, dass die Patientinnen einen signifikant niedrigeren Spiegel von sEpCAM aufweisen, und dass eine signifikant höhere Rate an Frühgeburten besteht.

Betrachtet man nun die Serumkonzentrationen in Bezug auf die Frühgeburten im Gesamtkollektiv, so ist festzustellen, dass die Konzentration von sICAM ($p = 0,292$) ebenfalls nicht mit einer vermehrten Frühgeburtlichkeit assoziiert ist. Im Gegensatz dazu lässt sich jedoch eine Assoziation zwischen der Serumkonzentration von sEpCAM und der Frühgeburtlichkeit ermitteln ($p = 0,037$). In unserem Kollektiv beobachten wir also, dass verminderte Serumkonzentrationen von sEpCAM bei Patientinnen mit Präeklampsie auftreten, zusätzlich jedoch auch unabhängig vom Vorliegen einer Präeklampsie mit einer erhöhten Frühgeburtlichkeitsrate assoziiert sind.

Die genauen Konzentrationen sind unten in Tabelle 24 dargestellt. Bei Patientinnen mit Frühgeburtlichkeit liegt eine mittlere Serumkonzentration von $16,89 \text{ U/ml} \pm 20,22$ vor. Diese ist deutlich geringer im Vergleich zu Patienten, bei denen keine Frühgeburt vorgelegen hat. Diese hatten im Mittel eine Serumkonzentration von sEpCAM von $29,92 \text{ U/ml} \pm 27,19$. Dieser Aspekt ist zusätzlich zur Veranschaulichung in Form eines Boxplots unten dargestellt.

Tabelle 24: Mittelwerte der Serumkonzentration von sEpCAM (in U/ml) bei Frühgeburten

Frühgeburt	N	Mittelwert	Standardabw.	Varianz	Median
ja	37	16,89	20,22	408,85	11,34
nein	30	29,92	27,19	739,30	24,60
Gesamt	67	22,73	24,30	590,49	18,80

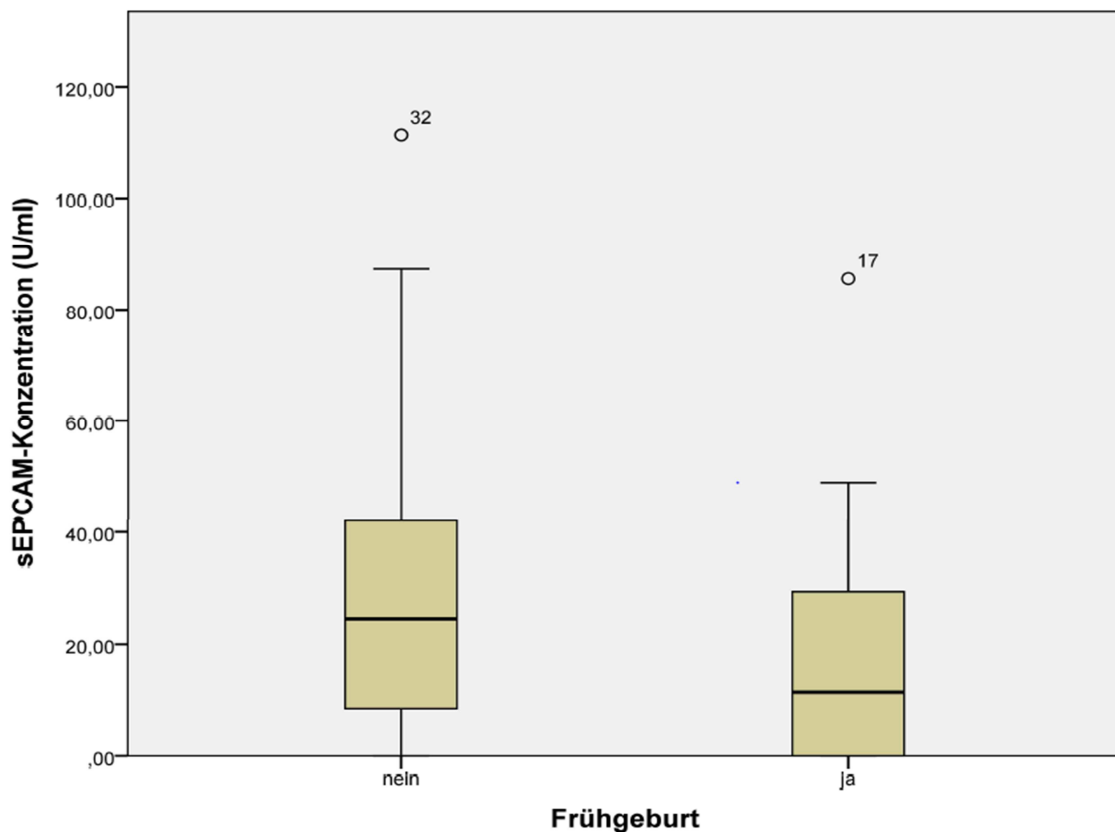


Abbildung 6: Boxplot zur Verteilung der sEpCAM-Konzentration über die Kategorie Frühgeburt

3.3.3 Einfluss von Gravidität und Parität auf die Serumkonzentration von sICAM und sEpCAM

Zuletzt erfolgt die Betrachtung, ob die Parameter der Gravidität und Parität einen Einfluss auf die Serumkonzentration von sICAM und sEpCAM haben.

Wie oben in der Einleitung dargestellt, haben erstgebärende Frauen ein höheres Risiko, eine Präeklampsie zu entwickeln als Multiparae. Daher ist es prinzipiell denkbar, dass diese Parameter mit veränderten Serumkonzentrationen von Adhäsionsmolekülen assoziiert sind.

Die Analyse erfolgte als Analyse zweier unabhängiger Stichproben bei nicht normalverteilten Variablen mittels Mann-Whitney-U-Test. Tabellarisch dargestellt ist jeweils die Signifikanz in Form des p-Wertes.

Tabelle 25: Mann-Whitney-U-Test über die Verteilung von sICAM über die Kategorien von Gravidität und Parität

Nullhypothese: Die Verteilung von sICAM über die Kategorien ist gleich	
Gravidität	0,762
Parität	0,294

Tabelle 26: Mann-Whitney-U-Test über die Verteilung von sEpCAM über die Kategorien von Gravidität und Parität

Nullhypothese: Die Verteilung von sEpCAM über die Kategorien ist gleich	
Gravidität	0,496
Parität	0,299

Unsere Analysen zeigen also, dass weder die Gravidität noch die Parität einen relativen Einfluss auf die sICAM- oder sEpCAM-Konzentrationen im Serum haben.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden potentielle Assoziationen der Adhäsionsmoleküle sICAM und sEpCAM mit dem Krankheitsbild der Präeklampsie untersucht. Zum einen wurden die Serumkonzentrationen dieser Moleküle untersucht, zum anderen erfolgte die Betrachtung von drei singulären Nukleotid Polymorphismen in diesem Kontext. Diese Polymorphismen, einer für ICAM-1 (rs5498) und zwei für EpCAM (rs1126497 und rs1421), wurden auf mögliche Assoziationen mit den Serumkonzentrationen untersucht. Außer der reinen Assoziation mit der Präeklampsie wurden klinische geburtshilfliche Parameter wie Frühgeburtlichkeit, Geburtsgewicht, Gravidität und Parität untersucht.

Besonderes Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf sEpCAM gelegt. Soweit bekannt, wurde bisher keine Studie durchgeführt, in der die Rolle von sEpCAM bei der Präeklampsie untersucht wurde. Außer der verstärkten Expression von EpCAM bei verschiedenen gynäkologischen Tumoren wurde die Rolle von EpCAM bei der Plazentation bei Mäusen gezeigt. Da die Plazentation in der Pathophysiologie der Präeklampsie eine herausragende Rolle spielt, erscheint es plausibel, dass EpCAM bei der Präeklampsie eine wichtige Rolle spielen könnte.

Mittels ELISA konnte in der Tat ermittelt werden, dass die Serumkonzentrationen von sEpCAM bei Patientinnen mit einer Präeklampsie signifikant niedriger waren als bei gesunden Kontrollen. Der p-Wert lag bei 0,003. Die Varianz der Werte ist leider groß, so dass eine klinische Anwendung sicherlich als schwierig zu beurteilen ist. Ob es prospektiv möglich ist, sEpCAM im Rahmen der Diagnostik anzuwenden, ist fraglich. Entscheidend wäre hier die Frage, ob eine Veränderung der Serumkonzentration bereits vor Auftreten der klinischen Symptomatik nachweisbar ist. Sollte sich dies bestätigen, könnte diese Untersuchung einen Beitrag zur Früherkennung leisten und therapeutische bzw. weitere diagnostische Konsequenzen nach sich ziehen.

Um dieses Ergebnis erneut zu bestätigen, ist eine ergänzende Versuchsreihe mit einem deutlich größeren Patientenkollektiv in einer Follow-Up Studie zu empfehlen. Hier sollte der gesamte Schwangerschaftsverlauf prospektiv untersucht werden, um auch den Zeitpunkt des Konzentrationsabfalls von sEpCAM zu ermitteln.

Für weitere Arbeiten ergibt sich weiterhin die Möglichkeit, ein einfacheres Testverfahren für die serologische Bestimmung von sEpCAM zu entwickeln, um dies für eine Routinebestimmung zu etablieren und somit die bisherigen diagnostischen Verfahren wie die Doppleruntersuchung und die Bestimmung der sFLT-1/PIGF-ratio zu ergänzen.

Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Unterscheidung des Patientenkollektivs in schwere und leichte Krankheitsverläufe, um gegebenenfalls einen Unterschied der sEpCAM-

Konzentration in Abhängigkeit des Schweregrades der Erkrankung aufzudecken. Dies wäre sinnvoll, um bereits frühzeitig therapeutisch tätig zu werden. Dies war hier retrospektiv nicht mehr möglich, da die klinischen Daten retrospektiv aus den Patientenakten entnommen wurden, zudem wäre hierfür ein deutlich größeres Patientenkollektiv erforderlich.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Konzentration von sEpCAM und der Frühgeburtslichkeit gibt ($p = 0,037$). Da sich dieser Zusammenhang bei Betrachtung aller Probanden fand und nicht nur bei Patientinnen mit manifester Präeklampsie, ist zu erwägen, ob sEpCAM sich nicht nur als Prädiktor für die Präeklampsie eignen würde, sondern auch für eine generelle Vorhersagemöglichkeit für die Frühgeburt. In diesem Zusammenhang wäre eine weitere Studie angebracht, die zwischen den verschiedenen Ursachen für die Frühgeburtslichkeit unterscheidet und diese mit der Konzentration von sEpCAM korreliert. Zu unterscheiden wäre insbesondere eine Frühgeburt durch vorzeitige Wehentätigkeit oder einen vorzeitigen Blasensprung oder eine iatrogen ausgelöste Frühgeburt durch Geburtseinleitung beziehungsweise eine Sectio caesarea. Davon abzugrenzen sind wiederum Frühgeburten durch andere Ursachen wie beispielsweise Infektionen oder Substanzmissbrauch. In unseren Daten waren 59 % aller Frühgeburten bei Patientinnen durch eine Geburtseinleitung iatrogen bedingt. 41 % der Frühgeburten traten spontan ein. Was letztlich die Ursache für die verminderte Serumkonzentration von sEpCAM ist, bleibt bisher rein spekulativ. Wie bereits von Nagao et al. 2009 gezeigt, scheint EpCAM eine bedeutende Rolle bei der Plazentation und fetalen Entwicklung zumindest bei Mäusen zu spielen, da es bei Knock-out-Mäusen zu schweren Fehlbildungen und Entwicklungsabbrüchen kam. Ebenso konnten, wie bereits beschrieben, Poon et al. 2014 darstellen, dass EpCAM im Endothel des Uterus bei Ratten herunterreguliert wird und somit die Implantation der Blastozyste begünstigt. Ob dies auch analog auf den Menschen übertragbar ist, bleibt noch zu untersuchen.

Die genaue Rolle von sEpCAM ist letztlich nicht sicher geklärt. Legt man jedoch die bisher bekannten Erkenntnisse zu Grunde, könnte spekuliert werden, dass die verminderte Konzentration von sEpCAM im Serum von Präeklampsiepatientinnen in Zusammenhang mit einer verminderten Expression von EpCAM im Uterus bzw. der Plazenta einhergeht. Auch dies wäre ein Aspekt, der in einer Folgestudie überprüft werden könnte.

Zusätzlich wurde die Konzentration von sICAM im Serum der Patientinnen und der Kontrollgruppe mittels ELISA untersucht.

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied der Serumkonzentration von sICAM zwischen Patientinnen und der Kontrollgruppe gefunden werden ($p = 0,421$).

Wie vorab erwähnt, finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben zur Verteilung von sICAM bei Schwangeren mit Präeklampsie und bei normal verlaufenden Schwangerschaften.

In einer Studie von Abe et al. aus dem Jahr 2008 konnte gezeigt werden, dass Trophoblasten, die mit Serum von Präeklampsiepatientinnen stimuliert wurden, eine deutlich höhere Expression von ICAM-1 aufwiesen. In der Studie lag eine statistische Signifikanz vor, allerdings wurden in den Gruppen nur jeweils sechs Patienten betrachtet, wodurch die Aussagekraft entsprechend einschränkt wird und somit nicht sinnvoll auf eine Gesamtpopulation übertragen werden kann.

Bereits 1997 beschrieben Krauss et al. in ihrer Arbeit eine erhöhte Serumkonzentration von sICAM und sVCAM bei Patientinnen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom gegenüber gesunden Schwangeren und Patientinnen mit schwangerschaftsinduzierter Hypertonie ohne weitere Komplikationen.

Analog zu dieser Arbeit wurde in einer Arbeit von Chavarria et al. 2008 die Konzentration von sICAM im Serum von Präeklampsie-Patientinnen und gesunden Schwangeren bestimmt. Hier ergab sich bei Schwangeren mit Präeklampsie eine signifikant höhere Serumkonzentration von sICAM gegenüber den gesunden Kontrollen. Des Weiteren bestand ein signifikanter Unterschied zwischen leichten und schweren Fällen von Präeklampsie.

Im Gegensatz dazu ergab sich in einem ähnlichen prospektiven Studiendesign von Parra-Cordero et al. (2007) kein signifikanter Unterschied zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe. Ein Unterschied zu den vorherigen Studien war hier der Zeitpunkt der Blutentnahme, die bereits in der 18. SSW erfolgte und damit sehr früh war. Die Diagnosestellung der Präeklampsie erfolgte entsprechend retrospektiv. Zu diskutieren wäre somit, ob ein potentieller Anstieg von sICAM zu diesem Zeitpunkt noch nicht detektiert werden konnte.

Zu dem gleichen Ergebnis kamen Chaiworapongsa et al. 2002, die ebenfalls mittels ELISA die Serumkonzentration von sICAM bei gesunden Schwangeren und Präeklampsie-Patientinnen untersuchten. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in der sICAM-Konzentration gefunden werden. Der Zeitpunkt der Blutentnahme erfolgte in dieser Studie um die 31. SSW, also entsprechend später. In dieser Studie wurden 155 Schwangere einbezogen. Dadurch ist hier die statistische Aussagekraft als deutlich höher zu bewerten.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass in verschiedenen Studien unterschiedliche Aussagen bezüglich der Konzentration von sICAM gemacht werden konnten. In dieser Arbeit ließ sich das Ergebnis von Parra-Cordero et al. 2007 sowie Chaiworapongsa et al. 2002 bestätigen. Dies lässt vermuten, dass die Präeklampsie zwar durch veränderte

Konzentrationen von Adhäsionsmolekülen, z. B. VCAM oder PIGF gekennzeichnet ist, aber sICAM hier keine führende Rolle zu spielen scheint. sICAM ist besonders bei inflammatorischen Prozessen erhöht. Somit ist zu diskutieren, ob die inflammatorische Komponente bei der Präeklampsie überhaupt führend ist oder ob ein Anstieg von sICAM in einigen Studien möglicherweise auch durch sekundäre oder parallele Infektionen zurückzuführen ist.

Möglicherweise gibt es weitere klinische Faktoren, die als Variable die Konzentration von sICAM beeinflussen können, aber nicht sicher abgegrenzt werden konnten.

Obwohl teilweise in den Studien eine erhöhte Konzentration von sICAM bei der Präeklampsie beschrieben wurde, scheint es letztlich auf Grund der inkongruenten Ergebnisse nicht als zuverlässiger Marker zur Frühdiagnostik der Präeklampsie geeignet zu sein, die klinische Anwendbarkeit erscheint sehr unwahrscheinlich.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Betrachtung des ICAM-1-Polymorphismus rs5498 sowie der beiden TACSTD-1 Polymorphismen rs1126497 und rs1421 für EpCAM. Für rs5498 konnte kein signifikanter Unterschied bei der Konzentration von sICAM oder sEpCAM errechnet werden. Auch die Verteilung von Patientinnen und gesunden Kontrollen über die Ausprägung der Genotypen wies keinen signifikanten Unterschied auf. Wie vorab beschrieben, hatte sich in diversen Studien gezeigt, dass der Polymorphismus mit dem vermehrten Auftreten verschiedener Erkrankungen assoziiert ist. Dies scheint nach unseren Ergebnissen jedoch nicht auf die Präeklampsie zuzutreffen.

Für rs1126497 stellte sich eine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen den Gruppen dar. Der Genotyp CT fand sich bei 25 Patientinnen, aber nur bei acht Schwangeren aus der Kontrollgruppe. Der Genotyp TT hingegen fand sich bei acht Patientinnen und bei 15 gesunden Kontrollen. Das Ergebnis ist mit $p = 0,009$ statistisch signifikant.

In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des T-Allels und dem Auftreten diverser Karzinome wie bei Yang et al. 2014 und Yu et al. 2012 vorbeschrieben und das T-Allel wurde als Risikofaktor gewertet. Die Größe der Gruppen in unserer Arbeit ist klein und daher sollten diese Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden. Dennoch kann im Hinblick auf die bereits vorbeschriebene Assoziation mit einem anderen Krankheitsbild ein funktioneller Effekt des Polymorphismus diskutiert werden.

Für den Polymorphismus rs1421 konnte in dieser Arbeit bei Betrachtung der sICAM-Konzentration und sEpCAM-Konzentration kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden. Bei Betrachtung der Zugehörigkeit zur Patienten- und Kontrollgruppe konnte auf Grund der zu kleinen Subgruppen keine statistische Signifikanz berechnet werden. Bei rein deskriptiver Betrachtung der Verteilung

ist aber zu erkennen, dass es keinen wesentlichen Unterschied bei der Ausprägung über die Genotypen in der Patienten- und Kontrollgruppe gibt.

Zusammenfassend ließ sich nicht zeigen, dass die analysierten SNPs mit einem erhöhten Auftreten von Präeklampsie vergesellschaftet sind. Eine klinische Anwendbarkeit erscheint daher nicht gegeben.

Für die klinischen Parameter konnten wir in unserem Patientinnenkollektiv sehen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration von sEpCAM und Frühgeburtlichkeit besteht. Außerdem kam es im Patientenkollektiv insgesamt zu einer signifikant erhöhten Anzahl an Frühgeburten ($p = 0,015$), was jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach darüber zu erklären ist, dass die Beendigung der Schwangerschaft die einzig kausale Therapie der Präeklampsie darstellt. Diese Frühgeburten sind also durch iatrogene Frühgeburtlichkeit im Rahmen von Geburtseinleitungen und vorzeitigen Kaiserschnittentbindungen zu erklären.

Eine Assoziation zwischen der Frühgeburtlichkeit und der Konzentration von sICAM oder den Polymorphismen konnte nicht festgestellt werden.

Des Weiteren bestanden keine relevanten Zusammenhänge zwischen dem Geburtsgewicht, der Gravidität oder der Parität mit der Konzentration von sICAM oder sEpCAM.

Als Schwäche dieser Arbeit ist sicherlich die relativ kleine Anzahl von Patientinnen zu sehen. Für den explorativen Charakter unserer Analysen erscheint diese Fallzahl ausreichend, für weitergehende Analysen wäre jedoch ein größeres Kollektiv erforderlich. In dieser Arbeit wurde ein Gesamtkollektiv von $n = 83$ betrachtet, wovon $n = 48$ zu dem Patientenkollektiv und $n = 35$ zur Kontrollgruppe gerechnet wurden. Durch die relativ kleine Fallzahl werden statistische Fehler somit überproportional stärker ins Gewicht fallen als bei entsprechend größeren Kollektiven. Auch wirkt sich die Eliminierung einzelner Laborparameter auf Grund von Messfehlern so deutlich stärker aus, beziehungsweise fallen somit einzelne miteinander bezogene Ausreißer entsprechend stärker ins Gewicht. Auch ist die statistische Berechnung bei größeren Kollektiven genauer, da die exakteren Testverfahren verwendet werden können und auch eher eine Normalverteilung der Daten im Kollektiv besteht. Es ist somit zu diskutieren, die Versuchsreihe noch einmal mit einem größeren Kollektiv durchzuführen, um so kleine Abweichungen besser herausmitteln zu können und das Ergebnis entsprechend zu bestätigen.

Des Weiteren beruhten die Diagnosestellung der Präeklampsie und die Erhebung der klinischen Parameter auf der Einschätzung mehrerer Ärzte.

Da diese Untersuchung Patientinnen in einer klinischen Notfallsituation inkludierte, die von verschiedenen Ärzten untersucht wurden, besteht ein Bias hinsichtlich der standardisierten Untersuchungsbedingungen. Die Befunderhebung muss häufig schneller erfolgen, um Schaden für Mutter und Kind abzuwenden, als es in einem reinen Studiendesign unter reinen Laborbedingungen erfolgen würde.

Die Diagnosestellung der Präeklampsie findet aber letztlich nach einem gleichbleibenden Schema statt. Die Erhebung der Blutdruckwerte und die Quantifizierung der Proteinurie lassen sich unter standardisierten Bedingungen erheben und sind damit insgesamt gut vergleichbare und objektive Kriterien.

Bei der Bearbeitung der Serumproben wurden geeichte Laborgeräte verwendet. Allerdings könnten variierende äußere Einflüsse wie die Temperatur, der Luftdruck oder die Luftfeuchtigkeit sich auf die Versuchsreihen auswirken und könnten zu interexperimentellen Abweichungen führen. Diese Art von Fehler kann man minimieren, indem die Testverfahren immer konsequent unter den exakt gleichen äußeren Bedingungen durchgeführt werden. Wir haben die Tests in diesem Fall alle im selben Labor durchgeführt, in dem durch Klimakontrolle weitgehend standardisierte Bedingungen herrschen und somit die äußeren Einflüsse minimiert wurden.

Besonders die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit des ELISA ist für Schwankungen der Temperatur oder unterschiedlichen Lichteinfall sensibel und fehleranfällig.

Während der Verarbeitung der Proben und der Versuchsabläufe durch Personen muss auch immer mit menschlichem Versagen gerechnet werden. Ungenauigkeiten bei der Verarbeitung, eine inkonstante Pipettiergeschwindigkeit oder das ungenaue Ablesen von Werten lassen sich bei den Versuchen naturgemäß nicht immer verhindern. Dies lässt sich natürlich zum einen durch möglichst genaues und sorgfältiges Arbeiten minimieren, zum anderen aber auch durch weitgehend maschinell und automatisiert ablaufende Prozesse. Da in dieser Versuchsreihe insbesondere die Platten für den sEpCAM-ELISA von Hand gecoated wurden, wurden alle Proben in dreifacher Ausführung aufgetragen, um Ungenauigkeiten zu minimieren.

Weiterhin wurden während der Versuchsreihe Seren verwendet, welche bei -80°C gefroren waren. Die Sammelzeit der Seren erfolgte komplett vor der Durchführung des ELISAs. Dies bedeutet, dass das Alter der Blutproben unterschiedlich war und die Seren über einen unterschiedlich langen Zeitraum gefroren waren. Somit wäre es möglich, dass durch den Prozess des Einfrierens ein verfälschtes Ergebnis erzielt wurde. Eine Verbesserung dieses Prozesses ist durch die sofortige Verarbeitung der Seren ohne vorheriges Einfrieren zu erzielen oder die Sammelzeit der Materialien sollte möglichst kurz gehalten werden. Allerdings ist bei sofortiger Verarbeitung der Seren zu beachten, dass

bei nur inkompletter Befüllung der ELISA-Platten die Versuchsreihe entsprechend wirtschaftlich ineffizienter ablaufen würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fehlerreduktion der Versuchsabläufe insgesamt durch einen automatisierten Prozess mit maschinell gefertigten Produkten erreicht werden kann. Des Weiteren sind statistische Fehler durch eine entsprechende Vergrößerung des betrachteten Kollektivs zu reduzieren. Zuletzt ist die Einschränkung der beteiligten Personen sinnvoll, um Beobachtungsfehler möglichst gering zu halten und die Verblindung der Versuchsabläufe zur Minimierung von Beeinflussung durch die durchführenden Personen.

Abschließend lässt sich sagen, dass nach unseren Ergebnissen die verminderte Serumkonzentration von sEpCAM bei Schwangeren ein Parameter ist, der eine potentielle Rolle in der Frühdiagnostik der Präeklampsie haben könnte. Es bleibt noch zu ermitteln, zu welchem Zeitpunkt die Veränderung der Serumkonzentration eintritt, und ob sich diese bei unterschiedlichen Schweregraden der Erkrankung nochmals voneinander unterscheidet.

Außerdem bleibt zu untersuchen, ob die verminderte Serumkonzentration von sEpCAM im Rahmen einer Frühgeburtlichkeit ein sinnvoller Parameter ist oder dieser Effekt allein durch die iatrogene Frühgeburtlichkeit bei PE zu erklären ist.

5 Zusammenfassung

Die Präeklampsie (PE) stellt eine der häufigsten schwangerschaftsbezogenen Erkrankungen und eine der häufigsten Ursachen für Frühgeburtlichkeit, intrauteriner Wachstumsretardierung und maternale Mortalität dar. Die PE geht klinisch mit Hypertonie, Proteinurie und Ödemen einher. Die Frühdiagnostik erfolgt derzeit klinisch sowie durch Ultraschallkontrollen und die Bestimmung der sFlt-1/PIGF ratio. Die einzig kausale Therapie besteht in der Beendigung der Schwangerschaft.

Adhäsionsmoleküle spielen bei der Zelladhäsion, aber auch bei der Zellmigration und den Signalkaskaden eine wichtige Rolle. Ihnen kommt weiterhin eine Rolle bei der Plazentation zu, die bei der Pathophysiologie der PE eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

In dieser Arbeit wurde die Serumkonzentration von löslichem intercellular adhesion molecule (sICAM) und epithelial cell adhesion molecule (sEpCAM) bei gesunden Schwangeren ($n = 35$) und Schwangeren mit Präeklampsie ($n = 48$) mittels eines enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) untersucht. Darüber hinaus erfolgten eine Genextraktion und eine genetische Analyse eines Polymorphismus für ICAM-1 (rs5498) und zweier Polymorphismen für EpCAM (rs1126497 und rs1421). Mittels statistischer Analyse erfolgte die Betrachtung, ob sich zum einen sICAM und sEpCAM für die Frühdiagnostik der PE eignen, zum anderen ob die Zugehörigkeit zu einem Genotyp der Polymorphismen einen Risikofaktor für eine Präeklampsie darstellt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Patientinnen mit PE eine signifikant niedrigere Konzentration von sEpCAM vorlag als bei gesunden Kontrollen ($p = 0,003$). Für sICAM konnte kein Unterschied in der Serumkonzentration zwischen den Gruppen ermittelt werden. Zusätzlich bestand insgesamt eine signifikant niedrigere Konzentration von sEpCAM bei Schwangeren, die im Verlauf eine Frühgeburt hatten ($p = 0,037$) und zwar unabhängig davon, ob eine Präeklampsie vorlag.

Zusätzlich war der Polymorphismus rs1126497 mit einem erhöhten Auftreten einer Präeklampsie assoziiert. Es bestand eine signifikant unterschiedliche Verteilung über die Genotypen, wobei Patientinnen vermehrt CC/CT und gesunde Kontrollen vermehrt TT aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verminderte Serumkonzentration von sEpCAM bei Schwangeren ein guter Parameter sein könnte, um eine Präeklampsie frühzeitig zu diagnostizieren. Eine Reevaluation an einem größeren Patientenkollektiv erscheint diesbezüglich vielversprechend. In diesem Kontext könnte auch ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt die Veränderung der Serumkonzentration eintritt und ob sich diese bei unterschiedlichen Schweregraden der Erkrankung nochmals voneinander unterscheidet. Somit könnten sowohl frühzeitig Hinweise auf das Auftreten der Erkrankung, als auch auf die zu erwartende klinische Ausprägung gefunden werden.

6 Literaturverzeichnis

Zeitschriftenaufsätze

1. Abe, E., Mastsubara, K., Oka, K., Kusanagi, Y., Ito, M. (2008):
Cytokine regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on trophoblasts in preeclampsia.
Gynecol Obstet Invest 66, 27-33
2. Amorim, M.M.R., Santas, L.C., Faundes, A. (1999):
Corticosteroid therapy for prevention of respiratory distress syndrome in severe preeclampsia.
Am J Obstet Gynecol. 180, 1283–1288
3. Baeuerle, P.A., Gires, O. (2007):
EpCAM (CD326) finding its role in cancer.
Br J Cancer 96(3), 417-423
4. Balzar, M., Bakker, H.A., Briaire-de-Bruijn, I.H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., Litvinov, S.V. (1998):
Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule.
Mol Cell Biol 18(8), 4833-4843
5. Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J., Litvinov, S.V. (1999):
The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM).
J Mol Med 77, 699-712
6. Balzar, M., de Briaire, I.H., Rees-Bakker, H.A.M., Prins, F.A., Helfrich, W., de Leij, L., Riethmüller, G., Alberti, S., Warnaar, A.O., Fleuren, G.J., Litvinov, S.V. (2001):
Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions.
Mol Cell Biol 21, 2570-2580
7. Bancher-Todesca, D., Chalubinski, K., Hohlagschwandtner, M., Husslein, P. (1998):
Die Präeklampsie.
J Hyperton 2, 7-15
8. Baumwell, S., Karumanchi, S.A. (2007):
Pre-Eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms.
Nephron Clin Pract 106, 72-81
9. Bella, J., Kolatkar, P.R., Marlor, C.W., Greve, J.M., Rossmann, M.G. (1998):
The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-A suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as LFA-1 integrin ligand.
Biochemistry 95, 4140-4145
10. Bielinski S.J., Pankow, J.S., Li, N., Hsu, F.C., Adar, S.D., Jenny, N.S., Bowden, D.W., Wasserman, B.A., Arnett, D. (2008):
ICAM1 and VCAM1 polymorphisms, coronary artery calcium, and circulating levels of soluble ICAM-1: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA).
Atherosclerosis 201(2), 339-344

11. Bielinski S.J., Reiner, A.P., Nickerson, D., Carlson, C., Bailey, K.R., Thyagarajan, B., Lange, L.A., Boerwinkle, E.A., Jacobs, D.R., Gross, M.D. (2011):
Polymorphisms in the ICAM1 gene predict circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1).
Atherosclerosis 216(2), 390-394
12. Breuhahn, K., Baeuerle, P.A., Peters, M., Prang, N., Töx, U., Köhne-Volland, R., Dries, V., Schirmacher, P., Leo, E. (2006):
Expression of epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) in chronic (necro-) inflammatory liver diseases and hepatocellular carcinoma.
Hepatol Res 34(1), 50-56
13. Brookes, A.J. (1999):
The essence of SNPs.
Gene 234, 177–186
14. Brosens, I., Pijnenborg, R., Vercruysse, L., Romero, R. (2006):
The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation.
Am J Obstet Gynecol 204(3), 193–201
15. Burges, A., Wimberger, P., Kümper, C., Gorbounova, V., Sommer, H., Schmalfeldt, B., Pfisterer, J., Lichinitser, M., Makhson, A., Moiseyenko, V., Lahr, A., Schulze, E., Jäger, M., Ströhlein, M.A., Heiss, M.M., Gottwald, T., Lindhofer, H., Kimmig, R. (2007):
Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study.
Clin Cancer Res 13(13), 3899-3905
16. Burrows, T.D., King, A., Loke, Y.W. (1993):
Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation.
Placenta 15, 21-33
17. Cai, G., Ma, X., Zou, W., Huang, Y., Zhang, J., Wang, D., Chen, B. (2013):
Prediction value of intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms for epithelial ovarian cancer risk, clinical features, and prognosis.
Gene 546, 117-123
18. Chaiworapongsa, T., Romero, R., Yoshimatsu, J., Espinoza, J., Kim, Y.M., Park, K., Kalache, K., Edwin, S., Bujold, E., Gomez, R. (2002):
Soluble adhesion molecule profile in normal pregnancy and pre-eclampsia.
J Matern Fetal Neonatal Med 12(1), 19-27
19. Chavarria, M.E., Lara, Gonzales, Garcia-Paleta, Y, Vital-Reyes, V.S., Reyes, A. (2008):
Adhesion molecules changes at 20 gestation weeks in pregnancies complicated by preeclampsia.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 137, 157-164
20. Chappell, L.C., Seed, P.T., Briley, A.L., Kelly, F.J., Lee, R., Hunt, B.J., Parmar, K., Bewley, S.J., Shennan, A.H., Steer, P.J., Poston, L. (1999):
Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial.

Lancet 354, 810-816

21. Chelli, D., Hamdi, A., Saoudi, S., Jenayah, A.A., Zagre, A., Jguerim, H., Bedis, C., Sfar, E. (2016):
Clinical assessment of soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio for the diagnostic and the prognosis of preeclampsia in the second trimester.
Clin Lab 62(10), 1927-1932
22. Collins, F.S., Brooks, L.D., Chakravarti, A. (1998):
A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation.
Genome Res 8, 1229-1231
23. Craven, C.M., Morgan, T., Ward, K. (1998):
Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts.
Placenta 19, 241–252
24. Croy, B. A., He, H., Esadeg, S., Wei, Q. (2003):
Uterine natural killer cells; insight into their cellular and molecular biology from mouse modeling.
Reproduction 126, 149-160
25. Dekker, G.A. (1994):
Etiology and pathophysiology of preeclampsia.
Zentralbl Gynakol 116(2), 57-60
26. Douglas, K.A., Redman, C.W.G. (1994):
Eclampsia in the United Kingdom.
BMJ 309, 1365
27. Duley, L., Adadevoh, S., Atallah, A., Belixan, J., Carroli, G., George, K., Grant, A., Mahomed, K., Mehta, S., Mmiro, F., Moodley J., Neilson, J., Sheth, S., Walker, G., Chalmers, I., Collins, R., Munjanja, S., Redman, C. (1995):
Which anticonvulsant for women with eclampsia? Evidence from collaborative eclampsia trial.
Lancet 345, 1455-1463
28. Gaetani, E., Flex, A., Pola, R., Papaleo, P., De Martini, D., Pola, E., Aloï, F., Flore, R., Serricchio, M., Gasbarrini, A., Pola, P. (2002):
The K469E polymorphism of the ICAM-1 gene is a risk factor for peripheral arterial occlusive disease.
Blood Coagul Fibrinolysis 13(6), 483-488
29. Garner, P. (1995):
Type I diabetes mellitus and pregnancy.
Lancet 346, 157-161
30. Grothey, A., Heistermann, P., Philippou, S., Voigtmann, R. (1998):
Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-I (ICAMmI, CD54) in patients with non-small-cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-I and tumor stage.
Br J Cancer 77, 801-807
31. Heubner, M., Wimberger, P., Kasimir-Bauer, S., Singer, B., Ruf, P., Kimmig, R., Siffert, W. (2015):

- Single nucleotide polymorphisms of the EpCAM-coding gene TACSTD1 in patients with ovarian cancer and their potential translational aspects.
Arch Gynecol Obstet 292(6), 1367-1372
32. Heufelder, A. E., Bahn, R.S. (1993):
Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in sera of patients with Grave's ophthalmopathy and thyroid diseases.
Clin Exp Immunol 92, 296-302
 33. Hirano, H., Imai, Y., Ito, H. (2002):
Spiral artery of placenta: development and pathology – Immunohistochemical, microscopic and electronmicroscopic study.
Kobe J Med Sci 48, 13–23
 34. Hladunewich M., Karumanchi, S.A., Lafayette, R. (2007):
Pathophysiology of the Clinical Manifestations of Preeclampsia.
Clin J Am Soc Nephrol 2, 543-549
 35. Hu, M., Jian, L., Zhang, L., Zheng, J., You, Y., Deng, J., Li, H., Zhou, Y. (2012):
Functional polymorphism in the EpCAM gene is associated with occurrence and advanced disease status of cervical cancer in Chinese population.
Mol Biol Rep 39(7), 7303-7309
 36. Hung, T.H., Burton, G.J. (2006):
Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia.
Taiwan J Obstet Gynecol 45(3), 189–200
 37. Huppertz, B., Peeters, L.L. (2005):
Vascular biology in implantation and placentation.
Angiogenesis 8, 157–167
 38. Iwao, M., Morisaki, H., Morisaki, T. (2004):
Single-nucleotide polymorphism g.1548G > A (E469K) in human ICAM-1 gene affects mRNA splicing pattern and TPA-induced apoptosis.
Biochem Biophys Res Commun 317(3), 729-735
 39. Jiang, L., Zhang, C., Li, Y., Yu, X., Zheng, J., Zou, P., Li, Y., Bin, X., Lu, J., Zhou, Y. (2010):
A non-synonymous polymorphism Thr115Met in the EpCAM gene is associated with an increased risk of breast cancer in Chinese population.
Breast Cancer Res Treat 126(2), 487-495
 40. Kasper, M., Behrens, J., Schuh, D., Müller, M. (1995):
Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury.
Histochem Cell Biol 103(4), 281-286
 41. Kjaergaard, A.G., Dige, A., Nielsen, J.S., Tønnesen, E., Krog, J. (2016):
The use of soluble adhesion molecules sE-selectin, sICAM-1, sVCAM-1, sPECAM-1 and their ligands CD11a and CD49d as diagnostic and prognostic biomarkers in septic and critically ill non-septic ICU patients.
APMIS 124(10), 846-855
 42. Krauss, T., Kuhn, W., Lakoma, C., Augustin, H.G. (1997):

- Circulating endothelial cell adhesion molecules as diagnostic markers for the early identification of pregnant women at risk for development of preeclampsia.
Am J Obstet Gynecol 177(2), 443-449
43. Lee, C.J., Hsieh, T.T., Chiu, T.H., Chen, K.C., Lo, L.M., Hung, T.H. (2000):
Risk factors for pre-eclampsia in an Asian population.
Int J Gynecol Obstet 70, 327-333
 44. Lee, H.M., Kim, H.J., Won, K.J., Choi, W.S., Lee, K.Y., Bae, Y.M., Park, P.J., Park, T.K., Lee, Y.L., Lee, C.K., Kim, B. (2008):
Contribution of soluble intercellular adhesion molecule-1 to the migration of vascular smooth muscle cells.
Eur J Pharmacol 579, 260-268
 45. Lequin, R. M. (2005):
Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Clin Chem 51(12), 2415-2418
 46. Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A.M., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O. (1994):
Ep-CAM: A human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule.
J Cell Biol 125(2), 437-446
 47. Litvinov, S.V., Balzar, M., Winter, M.J., Bakker, H.A., Briaire-de Bruijn, I.H., Prins, F., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O. (1997):
Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins.
J Cell Biol 139(5), 1337-1348
 48. Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M. Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M., Gires, O. (2009):
Nuclear signalling by tumor-associated antigen EpCAM.
Nat Cell Biol 11(2), 162-171
 49. Maynard, S.E., Min, J.Y., Merchan, J.(2003):
Excess placental soluble fmslike tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia.
J Clin Invest 111(5), 649–658
 50. McCabe, S.M., Riddle, L., Nakamura, G.R., Prashad, H., Mehta, A., Berman, P.W., Jardieu, P. (1993):
sICAM-1 enhances cytokine production stimulated by alloantigen.
Cell Immunol 150(2), 364-375
 51. McCowan, L.M., Buist, R.G., North, R.A., Gamble, G. (1996):
Perinatal morbidity in chronic hypertension.
Br J Obstet Gynaecol 103, 123-129
 52. Merendino, R. A., Di Pasquale, G., Sturniolo G. C., Ruello, A., Albanese, V., Minciullo, P. L., Di Mauro, S., Gangemi, S. (2003):
Relationship between IL-18 and sICAM-1 serum levels in patients affected by coeliac disease: preliminary considerations.
Immunol Lett 85, 257-260
 53. Momburg, F., Moldenhauer, G., Hammerling, G.J., Moller, P. (1987):

- Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues.
Cancer Res 47, 2883-2891
54. Münz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., Gires, O. (2004):
The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation.
Oncogene 23(34), 5748-5758
 55. Myatt, L., Clifton, R.G., Roberts, J.M., Spong, C.Y., Hauth, J.C., Varner, M.W., Wapner, R.J., Thorp, J.M., Mercer, B.M., Grobman, W.A., Ramin, S.M., Carpenter, M.W., Samuels, P., Sciscione, A., Harper, M., Tolosa, J.E., Saade, G., Sorokin, Y., Anderson, G.D. (2012):
The utility of uterine artery Doppler velocimetry in prediction of preeclampsia in a low-risk population.
Obstet Gynecol 120(4), 815-822
 56. Myers, J. E., Baker, P. N. (2002):
Hypertensive diseases and eclampsia.
Curr Opin Obstet Gynecol 14(2), 119-25
 57. Paauw, N. D., Luijken, K., Franx, A., Verhaar, M.C., Titia Lely, A. (2016):
Long-term renal and cardiovascular risk after preeclampsia: towards screening and prevention.
Clin Sci 130, 239–246
 58. Pafilis, J., Batistatou, A., Iliopoulou, A., Tsanou, E., Bakogiannis, A., Dassopoulos, G., Charalabopoulos, K. (2007):
Expression of adhesion molecules during normal pregnancy.
Cell Tissue Res 329, 1-11
 59. Page, E.W., Christianson, R. (1976):
The impact of mean arterial pressure in the middle trimester upon the outcome of pregnancy.
Am J Obstet Gynecol 125, 740-746
 60. Parra-Cordero, M., Turan, O.M., Kaur, A., Pearson, J.D., Nicolaides, K.H. (2007):
Maternal serum soluble adhesion molecule levels at 11p0–13p6 weeks and subsequent development of pre-eclampsia.
J Matern Fetal Neonatal Med 20(11), 793–796
 61. Poon, C.E., Madawala, R.J., Day, M.L., Murphy, C.R. (2014):
EpCAM is decreased but still present in uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat: potential mechanism for maintenance of mucosal integrity during implantation.
Cell Tissue Res 359, 655-664
 62. Puthothu, B., Krueger, M., Bernhardt, M., Heinzmann, A. (2006):
ICAM1 amino-acid variant K469E is associated with paediatric bronchial asthma and elevated sICAM1 levels.
Genes Immun 7(4), 322-326
 63. Raymond, D., Peterson, E. (2011):
A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia.
Obstet Gynecol Surv 66(8), 497-506

64. Redman, C.W.G., Sacks, G.P., Sargent, I.L. (1999):
Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy.
Am J Obstet Gynecol 180, 499-506
65. Reubinoff, B.E., Schenker, J.G. (1991):
HELLP syndrome – a syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes and low
platelet count – complicating preeclampsia-eclampsia.
Int J Obstet 36, 95-102
66. Robertson, S.A., Ingman, W.V., O’Leary, S., Sharkey, D.J., Tremellen, K.P.
(2002):
Transforming growth factor β – a mediator of immune deviation in seminal plasma.
J Reprod Immunol 57, 109-128
67. Rothlein, R., Dustin, M.L., Marlin, S.D., Springer, T.A. (1986):
A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1.
J Immunol 137, 1270-1274
68. Saftlas, A.F., Olson, D.R., Franks, A., Atrash, H.K., Pokras, R. (1990):
Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States.
Am J Obstet Gynecol 163, 460-465
69. Saftlas, A.F., Levine, R.J., Klebanoff, M.A., Martz, K.L., Ewell, M.G., Morris, C.D.,
Sibai, B.M. (2003):
Abortion, changed paternity, and risk of preeclampsia in nulliparous women.
Am J Epidemiol 157, 1108-1114
70. Sargent, I.L., Germain, S.J., Sacks, G.P., Kumar, S., Redman, C.W. (2003):
Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia.
J Reprod Immunol 59(2), 153–160
71. Schmal, H., Czermak, B.J., Lentsch, A.B., Bless, N.M., Beck-Schimmer, B., Friedl,
H.P., Ward, P.A. (1998):
Soluble ICAM-1 activates lung macrophages and enhances lung injury.
J Immunol 161(7), 3685-3693
72. Schuurs, A.H., van Weemen, B.K. (1980):
Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool.
J Immunoassay 1(2), 229-249
73. Seeber, A., Braicu, I., Untergasser, G., Nassir, M., Fong, D., Botta, L., Gastl, G.,
Fiegl, H., Zeimet, A., Sehouli, J., Spizzo, G. (2015):
Detection of soluble EpCAM (sEpCAM) in malignant ascites predicts poor overall
survival in patients treated with Catumaxomab.
Oncotarget 6(28), 25017-25023
74. Seeber, A., Martowicz, A., Spizzo, G., Buratti, T., Obrist, P., Fong, D., Gastl, G.,
Untergasser, G. (2015):
Soluble EpCAM levels in ascites correlate with positive cytology and neutralize
catumaxomab activity in vitro.
BMC Cancer 15, 372-347
75. Sibai, B., Dekker, G., Kupferminc, M. (2005):
Pre-eclampsia

Lancet 365, 785-799

76. Sibai, B. (2005):
Detection, prevention and management of eclampsia.
Obstet Gynecol 105(2), 402-410
77. Steinhard, J. Klockenbusch, W. (1999):
Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Präeklampsie: Risikofaktoren und Vorhersagemöglichkeiten.
Gynäkologe 32, 753-760
78. Steiner, H. (2001):
Dopplersonographie bei Präeklampsie.
Speculum 19, 7-12
79. Taylor, R.N., Grimwood, J., Taylor, R.S., McMaster, M.T., Fisher, S.J., North, R.A. (2003):
Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies.
Am J Obstet Gynecol 188(1), 177–182
80. Tranquilli A. L., Brown, M. A., Zeeman, G. G., Dekker, G., Sibai, M. B. (2012):
The definition of severe and early-onset preeclampsia. Statements from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP).
Pregnancy Hypertens 3(1), 44-47
81. Trojano, M., Avolio, C., Ruggieri, M., De Robertis, F., Giuliani, F., Paolicelli, D., Livrea, P. (1998):
Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1) in serum and cerebrospinal fluid of demyelinating diseases of the central and peripheral nervous system.
Mult Scler 4, 39-44
82. Vatten, L.J., Skjaerven, R. (2004):
Is pre-eclampsia more than one disease?
BJOG 111, 298-302
83. Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C. (2006):
Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia
Nature Med 12(6), 642–649.
84. Verdonk, K., Visser, W., Van Den Meiracker, A.H., Danser, A.H. (2014):
The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad.
Clin Sci 126(8), 537–544
85. Veres, G., Helin, T., Arato, A., Färkkilä, M., Kantele, A., Suomalainen, H., Savilahti, E. (2001):
Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 and mucosal adhesion molecule $\alpha_4\beta_7$ integrin in small intestinal mucosa of adult patients with food allergy.
Clin Immunol 99, 353-359
86. Voller, A., Bidwell, D., Hultdt, G., Engvall, E. (1974):
A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria.
Bull World Health Organ 51(2), 209-211

87. Yang, Y., Fei, F., Song, Y., Li, X., Zhang, Z., Fei, Z., Su, H., Wan, S. (2014): Polymorphisms of EpCAM gene and prognosis for non-small-cell lung cancer in Han Chinese. *Cancer Sci* 105(1), 89-96
88. Zhou, Y., Damsky, C.D., Chiu, K., Roberts, J.M., Fisher, S. (1993): Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 91, 950-960
89. Zhou, Y., Damsky, C.D., Fisher, S. (1997): Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. *J Clin Invest* 99, 2152-2164

Onlineartikel

90. AWMF-S1-Leitlinie: Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen, aktueller Stand: 12/2013
<http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-018.html> (abgerufen am 18.02.2014)
91. Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, zuletzt abgerufen am 15.07.2017
http://www.bib-demografie.de/DE/ZahlenundFakten/08/Definitionen/definitionen_node.html
92. Buroker, N.E. (2014): Regulatory SNPs and transcriptional factor binding sites in ADRBK1, AKT3, ATF3, DIO2, TBXA2R and VEGFA. *Transcription* 5(4):e964559. doi: 10.4161/21541264.2014.964559
93. Ghasemi, A., Zahediasl, S. (2012): Normality tests for statistical analysis: A guide for Non-Statisticians. *Int J Endocrinol Metab* 10(2): 486-9 Doi: 10.5812/ijem.3505
94. Ghosh, S.K., Raheja, S., Tuli, A., Raghunandan, C., Agarwal, S. (2012): Serum PLGF as a potential biomarker for predicting the onset of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 285, 417–422, doi: 10.1007/s00404-011-1960-4
95. Knight, M., Duley, L., Henderson-Smart, D.J., King, J.F. (2000): Antiplatelet agents for preventing and treating pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD000492
96. Magee, L.A., Duley, L. (2003): Oral beta-blockers for mild to moderate hypertension during pregnancy. *Chochrane Database Syst Rev* 4, do: 10.1002/14651858CD002863
97. Nagao K., Zhu J., Heneghan M.B., Hanson, J.C., Morasso, M.I., Tessarollo, L., Mackem, S., Udey, M.C. (2009): Abnormal placental development and early embryonic lethality in EpCAM-Null-Mice. *PLoS ONE* 4(12): e8543. doi:10.1371/journal.pone.0008543

98. Verlohren, S., Herraiz, I., Lapaire, O., Schlembach, D., Moertl, M., Zeisler, H., Calda, P., Holzgreve, W., Galindo, A., Engels, T., Denk, J., Stephan, H. (2012):
The sFlt-1/PIGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients
Am J Obstet Gynecol 206, 58e1-8 doi: 10.1016/j.ajog.2011.07.037
99. Yu, X., Ge, N., Guo, X., Shen, S., Liang, J., Huang, X., Wan, S., Xing, J., Huang, Q., Yang, Y. (2014):
Genetic variants in the EPCAM gene is associated with the prognosis of transarterial chemoembolization treated hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus
PLoS One 9(4): e93416. doi: 10.1371/journal.pone.0093416

Bücher

100. Lüllmann-Rauch, R. (2006):
Taschenlehrbuch Histologie 2. Auflage
Stuttgart: Thieme-Verlagsgruppe

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AT1-AA	Angiotensin-1 Rezeptor
BMI	Body Mass Index
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
d	Tag
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EpCAM	Epithelial Cellular Adhesion Molecule
EpEX	Extrazelluläre Domäne von EpCAM
EpICD	Intrazelluläre Domäne von EpCAM
FHL2	four and a half LIM domain protein 2
G	Guanin
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung
i. v.	intravenös
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
MAC	macrophage antigen
MAD-II	Mittlerer arterieller Blutdruck im 2. Trimenon
mg	Milligramm
MIP-2	macrophage inflammatory protein 2
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
µl	Mikroliter
NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Präeklampsie
PlGF	placental growth factor
p. o.	per os
PS-2	Presenilin 2
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunassay
Rpm	rounds per minute
s	Sekunde
sEpCAM	lösliches epithelial cell adhesion molecule
sFlt	soluble fms-like tyrosine kinase
sICAM	lösliches intercellular adhesion molecule
SNP	single nucleotide polymorphism
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
TACE	TNF α converting enzyme
TGF	Transforming growth factor
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor α
U	Unit
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt natürlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Heubner für die gute und geduldige Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich bedanke mich besonders für die angenehme Zusammenarbeit, die vielen guten Ideen, die konstruktive Kritik und besonders für die Motivation, wenn es einmal schwierig war. Ich werde unsere gemeinsame Arbeit immer in guter Erinnerung behalten.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Team des Labors der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe um Frau Prof. Dr. Kasimir-Bauer bedanken. Alle hatten bei der experimentellen Durchführung immer ein offenes Ohr für Fragen und standen mir stets hilfsbereit zur Seite.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Stephanie Fechtner für die tolle Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern Dagmar und Udo Cueillette, die mir nicht nur meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben, sondern mir auch immer mit Rat und Tat zur Seite stehen. Ich kann mich immer auf euch verlassen. Zuletzt danke ich natürlich meinem Ehemann Philipp Hofmann, der mich immer motiviert hat, meine Klagen mit Geduld ertragen hat und mir immer Rückhalt gegeben hat.